

【物件名】

資料 8

【添付書類】



JP 2004-507250 A 2004.3.11

資料 8

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特許2004-507250

(2004-507250A)

(53) 公表日 平成18年3月11日 (2004.3.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F 1	テーマコード (参考)
C12N 15/00	C12N 15/00 ZNA A	2B030
A01H 5/00	A01H 5/00 A	4B024
C12N 1/15	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19	C12N 1/19	
C12N 1/21	C12N 1/21	

審査請求 未確定 予備審査請求 有 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-522513 (2002-522513)  
 (22) 出願日 平成14年5月28日 (2002.5.28)  
 (23) 優先権主張日 平成14年2月28日 (2002.2.28)  
 (24) 国際出願番号 PCT/JP2001/026788  
 (25) 国際公開番号 WO2002/018927  
 (26) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)  
 (31) 優先権主張番号 69/225,186  
 (32) 優先日 平成12年8月30日 (2000.8.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 58813450  
 ノース・キャロライナ・ステイト・ユニバ  
 リティ  
 アメリカ合衆国27695-8210 ノ  
 ース・キャロライナ州ローリー、キャンパス・  
 ボックス 8210、スイート1122  
 、リサーチ・ドライブ、2401番

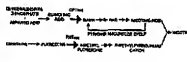
(74) 代理人 100059623  
 弁護士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100059623  
 弁護士 有馬 崇一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁護士 佐藤 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質合成を変化させる分子アロイを含むトランスジェニック植物

(57) 【要約】

本出願は、Nicotinoid産物に各エレメントを含む処理された植物、配列されたレベルのニコチンおよび/またはTSNAを中に有するトランスジェニックタバコ植物を産生する方法におけるおよびその使用、ならびにシス作用性アロイエレメントを中に含むために、変化したレベルの関心あるタンパク質を中に含む他の植物または微生物細胞について記述する。



(2)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a) 配列番号1に記載の配列またはそのフラグメントから実質的に構成され、該フラグメントが約20～455個の連続したヌクレオチドである、単離された核酸と、  
(b) 配列番号1の相補鎖にハイブリダイズし、且つ、Nicotinon産物に反応する、単離された核酸と  
からなる群から選択される単離された核酸。

## 【請求項2】

配列番号1として記載された配列またはそのフラグメントから実質的に構成され、該フラグメントが約20～455個の連続したヌクレオチドである、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項3】

配列番号1として記載された配列から実質的に構成される、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項4】

前記核酸がDNAである、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項5】

組換え核酸構築物をさらに含み、前記単離された核酸が該組換え核酸構築物に連結されており、該組換え核酸構築物がNtQPT1コード配列を含まない、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項6】

前記組換え核酸構築物が線状である、請求項5に記載の単離された核酸。

## 【請求項7】

前記組換え核酸構築物が環状である、請求項5に記載の単離された核酸。

## 【請求項8】

微粒子をさらに含み、前記単離された核酸が該微粒子に連結されている、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項9】

前記組換え核酸構築物がアグロバクテリウムベクターである、請求項5に記載の単離された核酸。

## 【請求項10】

請求項1に記載の単離された核酸を含む植物細胞。

## 【請求項11】

少なくとも1つの形質転換されたタバコ植物細胞を生じさせるために、Nicotinon産物応答エレメントから実質的に構成される核酸を、少なくとも1つのタバコ植物細胞に導入するステップであって、

最少少なくとも1つの形質転換されたタバコ植物細胞は、該核酸が存在しない場合に存在するであろうニコチンの量に比べて、該細胞から再生されるタバコ植物中のニコチンの量を低減させるのに十分なコピー数で該核酸を含有することを特徴とするステップと、  
該タバコ植物を得るために、該少なくとも1つの形質転換されたタバコ植物細胞を再生させるステップと  
を含む、低減された量のニコチンを有するトランスジェニックタバコ植物を産生する方法

## 【請求項12】

前記タバコ植物から葉を採集するステップをさらに含み、該タバコの葉が、前記核酸が存在しない場合に該タバコ植物存在するであろうニコチンの量に比べて低減された量のニコチンを含有する、請求項11に記載の方法。

## 【請求項13】

前記タバコ植物からタバコ種子を採集するステップをさらに含み、該タバコ種子が、前記核酸が存在しない場合に存在するであろうニコチンの量に比べて、該種子から再生される

(3)

JP 2004-307230 A 2004.3.11

タバコ植物のニコチンの量を低減させるのに十分なコピー数で該核酸を含有する、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記N1c遺伝子産物応答エレメントが、

(a) 配列番号1に記載の配列またはそのフラグメントから実質的に構成され、該フラグメントが約20~455個の連続したヌクレオチドである、単離された核酸と、

(b) 配列番号1の相補鎖にハイブリダイズし、且つN1c遺伝子産物に応答する、単離された核酸と

からなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

【請求項15】

前記N1c遺伝子産物応答エレメントが、配列番号1として記載された配列からなる、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記核酸が組換え核酸構築物内に含まれ、前記単離された核酸が該組換え核酸構築物に連結されており、該組換え核酸構築物がN1cQPT1コード配列を含まず、該組換え構築物が線状である、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

前記組換え核酸構築物が環状である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記核酸がDNAである、請求項11に記載の方法。

【請求項19】

前記導入するステップが環状の形質転換を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

前記導入するステップがアグロバクテリウム形質転換を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項21】

請求項11に記載の方法で産生されるタバコ植物。

【請求項22】

請求項21に記載のタバコ植物から採集されるタバコ葉。

【請求項23】

請求項21に記載のタバコ植物から採集されるタバコ種子。

【請求項24】

減少された量のニコチンを含有するタバコ植物であって、該植物が外因性核酸を含有する細胞を含み、該外因性核酸がN1c遺伝子産物応答エレメントから実質的に構成され、該外因性核酸が、該外因性核酸が存在しない場合に該植物に存在するであろうニコチンの量に比べて、該タバコ植物中のニコチンの量を減少させるのに十分なコピー数で該細胞内に含まれる、タバコ植物。

【請求項25】

前記N1c遺伝子産物応答エレメントが、

(a) 配列番号1に記載の配列またはそのフラグメントから実質的に構成され、該フラグメントが約20~455個の連続したヌクレオチドである、単離された核酸と、

(b) 配列番号1の相補鎖にハイブリダイズし、且つN1c遺伝子産物に応答する、単離された核酸と

からなる群から選択される、請求項24に記載のタバコ植物。

【請求項26】

前記N1c遺伝子産物応答エレメントが、配列番号1として記載された配列から実質的に構成される、請求項24に記載のタバコ植物。

【請求項27】

前記外因性核酸が組換え核酸構築物内に含まれ、前記単離された核酸が該組換え核酸構築物に連結されており、該組換え核酸構築物がN1cQPT1コード配列を含まず、該組換え構築物が線状である、請求項24に記載のタバコ植物。

(4)

JP 2004-507250 A 2004.3.21

## 【請求項28】

前記組換え核酸構築物が環状である、請求項27に記載のタバコ植物。

## 【請求項29】

前記外因性核酸がDNAである、請求項24に記載のタバコ植物。

## 【請求項30】

請求項24に記載のタバコ植物から採集されるタバコ葉。

## 【請求項31】

請求項24に記載のタバコ植物に成長するタバコ種子。

## 【請求項32】

請求項24に記載のタバコ植物から採集されるタバコ種子。

## 【請求項33】

変更された含量の関心あるタンパク質を中に有する植物を産生する方法であって、関心あるタンパク質はシス作動性エレメントにより制御されており、  
 該シス作動性エレメントを含む外因性核酸構築物を、少なくとも1つの植物細胞に導入して、少なくとも1つの形質転換された植物細胞を産生するステップを含み、  
 該シス作動性エレメントが、関心あるタンパク質に関するコード配列またはその相補鎖に作動可能に連結されていないという条件で、最少なくとも1つの形質転換された植物細胞が、該外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう関心あるタンパク質の量に比べて、該細胞から再生される植物中の関心あるタンパク質のレベルを増加または低減させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含有することを特徴とする方法。

## 【請求項34】

前記シス作動性エレメントが、アクティベーター化合物を結合するシス作動性活性化エレメントであり、該アクティベーター化合物が、前記植物における前記関心あるタンパク質の発現を増加させ、且つ前記少なくとも1つの形質転換された植物細胞が、前記外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう関心あるタンパク質の量に比べて、該細胞から再生される植物における関心あるタンパク質のレベルを低減させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含有する、請求項33に記載の方法。

## 【請求項35】

前記シス作動性エレメントが、リプレッサー化合物を結合するシス作動性リプレッサーエレメントであり、該リプレッサー化合物が、前記植物における前記関心あるタンパク質の発現を減少させ、且つ前記少なくとも1つの形質転換された植物細胞が、前記外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう関心あるタンパク質の量に比べて、該細胞から再生される植物における関心あるタンパク質のレベルを増加させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含有する、請求項33に記載の方法。

## 【請求項36】

前記形質転換された植物細胞から植物を発生させるステップをさらに含む、請求項33に記載の方法。

## 【請求項37】

前記植物から種子を採集するステップをさらに含む、該種子が、前記外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう前記関心あるタンパク質のレベルに比べて、該種子から再生される植物における関心あるタンパク質のレベルを低減させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含有する、請求項36に記載の方法。

## 【請求項38】

前記シス作動性エレメントが、UAS-1、ビリンボックス、サイトB、およびタバコRB7プロモーターの根に特異的なシス作動性エレメントからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

## 【請求項39】

前記外因性核酸が環状である、請求項33に記載の方法。

## 【請求項40】

前記外因性核酸が環状である、請求項33に記載の方法。

(3)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

【請求項41】

前記外因性核酸がDNAである、請求項33に記載の方法。

【請求項42】

前記導入するステップが同源的形質転換を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項43】

前記導入するステップがアグロバクテリウム形質転換を含む、請求項33に記載の方法。

【請求項44】

請求項33に記載の方法で産生される植物。

【請求項45】

請求項44に記載の植物から採集される、葉、果実、花、根または塊茎。

10

【請求項46】

請求項44に記載の植物から採集される種子。

【請求項47】

変更されたレベルの関心あるタンパク質を中に有する植物であって、該植物が外因性核酸を含有する細胞を含み、

該外因性核酸が、該植物における該関心あるタンパク質のレベルを制御するシス作動性エレメントを含み、

該シス作動性エレメントが該関心あるタンパク質に関するコード配列またはその相補鎖に作動可能に連結されていないという条件で、該細胞が、該外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう該関心あるタンパク質の量に比べて、該植物における該関心あるタンパク質のレベルを増加または低減させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含む植物。

20

【請求項48】

前記シス作動性エレメントが、アクティベーター化合物を結合するシス作動性活性化エレメントであり、該アクティベーター化合物が、前記植物における前記関心あるタンパク質の発現を増加させ、且つ前記少なくとも1つの形質転換された植物細胞が、前記外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう該関心あるタンパク質の量に比べて、該植物における該関心あるタンパク質のレベルを増加させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含有する、請求項47に記載の植物。

【請求項49】

前記シス作動性エレメントが、リプレッサー化合物を結合するシス作動性リプレッサーエレメントであり、該リプレッサー化合物が、前記植物における前記関心あるタンパク質の発現を減少させ、且つ前記少なくとも1つの形質転換された植物細胞が、前記外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう該関心あるタンパク質の量に比べて、該植物における該関心あるタンパク質のレベルを増加させるのに十分なコピー数で該外因性核酸を含有する、請求項47に記載の植物。

30

【請求項50】

前記外因性核酸が線状である、請求項47に記載の植物。

【請求項51】

前記外因性核酸が環状である、請求項47に記載の植物。

【請求項52】

前記外因性核酸がDNAである、請求項47に記載の植物。

40

【請求項53】

請求項47に記載の植物から採集される、葉、果実、花、根または塊茎。

【請求項54】

請求項47に記載の植物に成長する種子。

【請求項55】

請求項47に記載の植物から採集される種子。

【請求項56】

宿主細胞における関心あるタンパク質の発現を減少させる方法であって、該関心あるタンパク質の転写が、アクティベーター化合物を結合するシス作動性活性化エレメントによ

50

(5)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

で増強され、該アクティベーター化合物が、該宿主細胞における該関心あるタンパク質の発現を増加させ、

(a) 該シス作動性活性化エレメントを含むアコイ組換え核酸構築物を提供するステップと、

(b) 該シス作動性エレメントが、該関心あるタンパク質に関するコード配列またはその相補鎖に作動可能に連結されていないという条件で、該アコイ構築物を、該アクティベーター化合物に結合して該関心あるタンパク質の発現を低減させるのに十分な量で該宿主細胞に導入するステップとを含む方法。

【請求項 57】

前記宿主細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記宿主細胞が細菌細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

前記宿主細胞が真菌細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

前記宿主細胞が動物細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 61】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 62】

前記宿主細胞が維管束植物細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 63】

前記宿主細胞が単子葉植物細胞または双子葉植物細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 64】

前記アコイ構築物がプラスミドである、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 65】

宿主細胞における関心あるタンパク質の発現を増加させる方法であって、該関心あるタンパク質の転写が、リプレッサー化合物に結合するシス作動性リプレッサーエレメントによって低減され、該リプレッサー化合物が該宿主細胞における該関心あるタンパク質の発現を低減させ、

(a) 前記シス作動性活性化エレメントを含むアコイ組換え核酸構築物を提供するステップと、

(b) 該シス作動性エレメントが、該関心あるタンパク質に関するコード配列またはその相補鎖に作動可能に連結されていないという条件で、該アコイ構築物を、前記アクティベーター化合物に結合して、該関心あるタンパク質の発現を増加させるのに十分な量で該宿主細胞に導入するステップとを含む方法。

【請求項 66】

前記宿主細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記宿主細胞が細菌細胞である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 68】

前記宿主細胞が真菌細胞である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 69】

前記宿主細胞が動物細胞である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 70】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 71】

前記宿主細胞が維管束植物細胞である、請求項 65 に記載の方法。

(7)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

## 【請求項72】

前記宿主細胞が単子葉植物細胞または双子葉植物細胞である、請求項65に記載の方法。

## 【請求項73】

前記ゲノム構築物がプラスミドである、請求項65に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【関連出願】

本出願は、2000年8月30日出願の仮出願番号60/229,198(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)の利益を主張する。

## 【0002】

## 【発明の分野】

本発明は、変化した表現型、たとえば、低減されたニコチンレベルにつながる、その中のタンパク質含量が変化したトランスジェニックタバコ植物等の、トランスジェニック植物を産生する方法と共に、このようにして産生されたトランスジェニック植物、およびこのような植物の種子について説明する。

## 【0003】

## 【発明の背景】

ニコチンの常習性に関する懸念を考えると、低下したニコチンレベルを有するタバコを産生することは興味深い。さらに、極めて低レベルのニコチンを産生するか、またはニコチンを全く産生しないタバコ植物は、商業的に何値のある生成物、たとえば、医薬、化粧品成分、または食品添加物を発現する導入遺伝子のレシビエントとして魅力的である。ニコチンをタバコから除去するために、様々な方法が設計されてきた。しかし、これらの方法のほとんどは、ニコチンに加えて、他の成分もタバコから除去し、それによってタバコに悪影響を与える。古典的な作物育種技術は、野生型のタバコ植物でみられるより低レベルのニコチン(およそ8%)を含むタバコ植物をもたらした。ニコチン含量がさらに減少されたタバコ植物およびタバコが望ましい。

## 【0004】

ニコチンは、主としてタバコ植物の根で形成され、その後葉に輸送され、そこで貯蔵される(Tso, Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant, pp. 233-34, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pa. (1972))。ニコチンは、二つの別々の生命経路から生じる二つの前駆物質であるニコチン酸およびN-メチルピロリニウム(図1参照)の結合によって生成される(図1参照)(Bush and Saunders (1977) Proc. Am. Chem. Soc. Symp., New Orleans, pp. 389-425; Hashimoto and Yamada (1994) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 257-285; The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, P. K. Stumpf and E. E. Conn編, Academic Press, pp. 317-395中のWaller and Derner (1981))。ピリジンヌクレオチドサイクルは、ニコチン酸を合成する(Wagner et al. (1986) Planta 167, 226-232; Wagner and Wagner (1985) Planta 165, 532-537)が、N-メチルピロリニウムカチオン類は、オルニチンまたはアルギニンから腐敗(putrescence)を経て合成される(Encyclopedia of Plant Physiology, Secondary Plant Products, Vol. 3, E. A. Bell and B. V. Charlwood編, Springer-Verlag, pp. 65-91中のLeete (1980); Tiburcio and Galston (1986) Phytochemistry, 25, 107-110)。相互移植実験で、ニコチンは根で合成され、木部を経て葉および他の植物器官に輸送

(8)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

されることが証明された (Dawson (1941) Science, 94, 396-397)。

[0005]

二つの制御遺伝子座 (Nic1およびNic2) は、ニコチン産生を制御する。Leggら (1969) J. Hered. 60, 213-217) は、低アルカロイド含量のキューバ葉巻 (Cuban cigar) 品種からの遺伝子をバレー21 (Burley 21) 品種に組み込んだ。これらの研究者は、低アルカロイド系が、二つの遺伝子座 Nic1 (以前は、Aとして識別された) および Nic2 (以前は、Bとして識別された) にて、標準品種と異なることを示した。これらの二つの遺伝子座は、同一連鎖群に属さず、また遺伝子作用は半優性であり、主として付加的である (Legg et al. (1969) J. Hered., 60, 213-217)。Collinsら ((1974) Corp. Sci., 14, 77-80) は、これらの四つのアルカロイド遺伝子型の倍化半数体タバコ育種系を作製した。標準品種の遺伝子型は、Nic1/Nic1 Nic2/Nic2であり、低ニコチン系のそれは、nic1/nic1 nic2/nic2である。Nic1/Nic1 nic2/nic2は、高中間体であり、nic1/nic1 Nic2/Nic2は低中間体である (Legg and Collins (1971) Can. J. Genet. Cytol. 13, 287-291)。これらの系は、開花までの日数、葉の枚数、葉のサイズ、および植物の高さが似ている。単一および二重のニコチン酸誘導体の酵素分析から、二つの酵素、キノリネートホスホリボキシルトランスフェラーゼ (QPTase) および腐敗メチルトランスフェラーゼ (PMTase) の活性は、ニコチン生成のレベルに正比例していることがわかる (Saunders and Bush (1979) Plant Physiol. 64:236)。Nic1および Nic2は共に、根におけるPMTase活性およびQPTase活性に影響を及ぼし、従って、ニコチン合成を制御する (Leete (1983) In: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, S. W. Pelletier編, John Wiley & Sons, pp. 85152)。

[0006]

Hibiら ((1994) Plant Cell, 6, 723-735) は、PMTaseをコードするcDNAであるPMTを単離し、PMT転写物レベルは、Nic1および Nic2によって制御されることを示した。QPTase cDNAおよびゲノムクローニング (NtQPT1) も単離されており、NtQPT1の転写物レベルもNic1および Nic2によって制御される (Song, W., Mendu, N., and Conkling, M. A., (1999) Plant Cell, 準備中)。従って、Nic遺伝子座は、二つの律速酵素、即ちPMTaseおよびQPTaseを、コードする遺伝子の転写物レベルを制御することにより、ニコチン含量を制御するようである。さらに、Nic1および Nic2は、NtQPT1転写の陽性制御因子であること、また、転写開始部位の上流のプロモーター配列は、NtQPT1転写のNic遺伝子産物活性化に必要なシス作用性配列を含有することが証明されている。QPTaseおよびPMTaseの発現は、Nic遺伝子産物によって同等に制御されるため、Nic遺伝子産物は、PMT遺伝子の転写も直接制御するようである。

[0007]

ニコチン等の生物学的産物のレベルを低減させる1つのアプローチは、この産物につながる合成経路に必要な酵素 (すなわちQPTaseおよびPMTase) の量を減少させることである。影響を受ける酵素が、律速量 (その経路に必要な他の酵素と比較して) で自然に生じる場合、その酵素の発生量が減少することにより、最終生成物の生産量が減少する。この酵素の量が常態で律速でなければ、この経路の生産を減少させるためには、細胞中におけるその存在を、律速レベルまで減少させなければならない。反対に、天然に生じる酵素量が律速であれば、この酵素活性が上昇すると、合成経路の最終生成物が増加する結果となる。腐敗メチルトランスフェラーゼ (PMTase) 発現のアンチセンス制御による、タバコ植物におけるニコチンレベル修飾は、NakataniとMalikに 50



(9)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

付与された米国特許第5,369,023号および第5,260,205号で提案されている。WahadとMalikに付与されたPCT出願WO94/28142号には、PMTをコードするDNAおよびセンスおよびアンチセンスPMT構築物の使用について記載されている。さらに、Conklingらに付与されたPCT出願WO98/56923号には、植物キノレートホスホリボシトランスフェラーゼ (QPRTase) 酵素をコードするDNA、このようなDNAを含む構築物、および植物におけるニコチン産生を増加または減少させるために、QPRTase発現を変化させる三つの方法が記載されている。これまでの努力および成功にもかかわらず、依然として、植物における遺伝子産物 (たとえば、ニコチン) の産生を減少させる新しいアプローチが必要なままである。

【0008】

【発明の概要】

本発明の第一の態様は、シス作動性制御要素を含む (comprise)、実質的にシス作動性制御要素からなる (consisting essentially of)、またはシス作動性制御要素からなる (consisting of)、単離された核酸分子 (たとえば、プラスミド)、および変化したレベル (たとえば、増加されたレベルまたは低減されたレベル) の関心あるタンパク質を中に有するトランスジェニック植物または宿主細胞を産生するための、このような単離された核酸の使用である。

具体例は、Nic遺伝子産物応答要素 (たとえば、Nic遺伝子産物に結合するDNA配列) であり、たとえば、(a) 配列番号1による配列またはそのフラグメントを有する単離された核酸であって、該フラグメントは、望ましくは、少なくとも連続した20〜455個のヌクレオチド、好ましくは、少なくとも連続した30〜400個のヌクレオチド、より好ましくは、連続した50〜350個のヌクレオチド、最も好ましくは、連続した100〜300個または200〜400個のヌクレオチドから実質的に構成される (consisting essentially of)、またはこれらから構成される (consisting of) 単離された核酸であり、および (b) 配列番号1の相補鎖にハイブリダイズして、Nic遺伝子産物を結合するか、またはNic遺伝子産物に応答する (すなわち、作動可能に結合した遺伝子の転写を増加または減少させ、その結果、宿主細胞における、コードされた関心あるタンパク質のレベルを増加または低減させる) 単離された核酸である。

【0009】

Nic遺伝子産物応答要素は、米国特許第5,459,252号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に開示された配列から得ることもできる。幾つかの実施形態では、Nic遺伝子産物応答要素は、NtQPT1プロモーターの-1000から-600または-700bpまでの間にあり、その配列は米国特許第5,459,252号に開示されている。従って、幾つかの実施形態は、米国特許第5,459,252号に開示されている、-1000から-600または-700までの間の、NtQPT1プロモーターに対応する、300〜400ヌクレオチド長さの、NtQPT1プロモーターのフラグメントを含む。

【0010】

本発明の第二の態様は、シス作動性制御要素、たとえば、上述のNic遺伝子産物応答要素を含む組換え核酸構築物、ならびに本明細書に記載のトランスジェニック植物または宿主細胞を産生するための、このような組換え核酸の使用である。この構築物は、弾道的核酸転移粒子 (ballistic nucleic acid transfer particle) またはアグロバクテリウムベクター等のベクターであってもよい。このような構築物および好ましくはその複製のコピーを含有する植物細胞も、本発明の態様である。

【0011】

本発明のさらなる態様は、減少されたニコチン含量および/またはタバコ特異的ニトロソアミン類 (TSNA) を有するトランスジェニックタバコ植物を産生する方法である。この方法は、少なくとも1つの形質転換されたタバコ植物細胞を作るために、上述のNic

10

20

30

40

50

(10)

JP 2004-507259 A 2004.3.11

遺伝子産物応答エレメントを含む外因性核酸断片を、上記少なくとも1つのタバコ植物細胞に導入することを含む。この少なくとも1つの形質転換タバコ植物細胞は、外因性核酸が存在しない場合に存在するであろうニコチンおよび/またはTSNAレベルと比べて、その細胞から再生されるタバコ植物のニコチンおよび/またはTSNAレベルを低減させるのに十分な量またはコピー数で外因性核酸を含む。この方法は、形質転換された植物細胞からタバコ植物を再生させること、および(任意選択的に)タバコ葉、幹、または種子をタバコ植物から収獲するステップをさらに含んでもよい。従って、上記方法により再生させた葉、幹および種子タバコ植物も、本発明の態様である。

[0012]

本発明のさらなる態様は、低減されたレベルのニコチンおよび/またはTSNAを中に有するタバコ植物であり、その植物は外因性核酸を含む細胞を含み、その外因性核酸は上述のNic遺伝子産物応答エレメントを含む。この外因性核酸は、外因性核酸が存在しない場合にその植物に存在するであろうニコチンレベルと比べて、タバコ植物のニコチンレベルを低減させるのに十分なコピー数で細胞に含まれる。また、このような植物の葉、幹および種子も、本発明の態様である。

[0013]

上記トランスジェニックタバコ植物から作製される、喫煙材料(たとえば、シガレット、シガー、パイプタバコ)、喫煙タバコ、喫煙タバコ、ガム、トロリーチを含むが、その限りではないタバコ製品も、本発明の実施形態である。好ましくは、これらのタバコ製品は、切断し、乾燥させ、保存処理し、および/またはタバコ作製における従来技術に従って醗酵させておいた、取種されたタバコ葉および/または幹から製造される。しかし、保存処理およびタバコ加工における改良された技術を実施して、TSNAレベルをさらに低下させることができる。幾つかの実施形態では、ニコチンおよび/またはTSNAを実質的に含まずに作られるタバコは、様々なバレータバコ(Burley tobacco)たとえば、バレー21、東洋タバコ(Oriental tobacco)、または火力乾燥タバコ(Blue-Cured tobacco)から作製される。しかし、ほとんどのタバコ変種は、本明細書に記載の実施形態を使用して、ニコチンおよび/またはTSNAを含まないように製造できることを理解すべきである。

[0014]

さらなる実施形態は、所望のレベルのニコチンおよび/またはTSNAが得られるように注意深くブレンドされたタバコ製品を含む。たとえば、実質的に任意の量のニコチンおよび/またはTSNAを得るために、上述の通りに作製された、低減されたレベルのニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコを、従来のタバコとブレンドすることができる。さらに、所望の量のニコチンおよび/またはTSNAを実現するために、低減されたレベルのニコチンおよび/またはTSNAを有する、2種類以上のタバコをブレンドしてよい。この方式で、変種、風味、ならびにニコチンおよび/またはTSNAの違いを、徐々に調整することができる。これらのブレンドされたタバコ製品を、タバコ使用中止キット類およびニコチン依存性および発癌性の可能性を減少または排除するように設計されたプログラム類に組み込むことができる。このようなキット類およびプログラム類も、本発明の実施形態である。

[0015]

本発明のより多くの実施形態は、シガレット、シガー、喫煙タバコ、喫煙タバコおよびタバコ含有ガムおよびトロリーチを含む、タバコ製品の発癌性の可能性を減少させる方法に関する。幾つかの方法は、たとえば、減少された量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコの作製および上記タバコを含有するタバコ製品の製造を含む。従って、上述のトランスジェニックタバコ植物が、取種され、保存処理され、タバコ製品に加工される。これらのタバコ製品は、減少された量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコから作製されるため、低減された発癌性の可能性を有する。

[0016]

本発明のまた別の態様は、タバコを喫煙、消費または他の方法で摂取するヒトにおける、

(11)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

T S N Aおよびその代謝物の量の低減に関する。この方法は、上述の減少された量のT S N Aを有するタバコ製品を、上記ヒトに提供し、それによって、上記ヒトにおける、このような製品の発癌性の可能性を低下させることによって実施される。

【0017】

より一般的には、本発明は、関心あるタンパク質の増加された含量または低減された含量を有する植物を産生する方法であって、関心あるタンパク質が、(i) アクティブーター化合物を結合するシス作動性活性化エレメントであって、そのアクティブーター化合物が上記植物における上記関心あるタンパク質の発現を増加させることを特徴とする、シス作動性活性化エレメント、および(ii) リプレッサー化合物を結合するシス作動性リプレッサーエレメントであって、そのリプレッサー化合物が上記植物における上記関心あるタンパク質の発現を減少させることを特徴とする、シス作動性リプレッサーエレメント、からなる群から選択されるシス作動性エレメントによって制御される方法を提供する。本方法は、少なくとも1つの形質転換植物細胞を作るために、上記シス作動性エレメントを含む外因性核酸構築物を、少なくとも1つの植物細胞に導入するステップを含み、この少なくとも1つの形質転換された植物細胞は、上記外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう上記関心あるタンパク質の量に比べて、上記細胞から再生される植物における上記関心あるタンパク質のレベルを増加または低減させるのに十分なコピー数で、外因性核酸を含有する。

【0018】

従って、本発明は、一般に、増加されたレベルまたは低減されたレベルの関心あるタンパク質を中に有する植物(およびその部分)であって、外因性核酸を含有する細胞を含み、その外因性核酸が(i) アクティブーター化合物を結合するシス作動性活性化エレメントであって、そのアクティブーター化合物が上記植物における上記関心あるタンパク質の発現を増加させることを特徴とするシス作動性活性化エレメント、および(ii) リプレッサー化合物を結合するシス作動性リプレッサーエレメントであって、そのリプレッサー化合物が上記植物における上記関心あるタンパク質の発現を低減させることを特徴とするシス作動性リプレッサーエレメントからなる群から選択されるシス作動性エレメントを含み、その細胞が、外因性核酸が存在しない場合に存在するであろう関心あるタンパク質の量に比べて、植物における関心あるタンパク質のレベルを増加または低減させるのに十分なコピー数で外因性核酸を含有する植物を提供する。

【0019】

従って、本発明は、(原核または真核)宿主細胞における関心あるタンパク質の発現を減少させる一般的な方法であって、関心あるタンパク質の転写が、アクティブーター化合物を結合するシス作動性活性化エレメントによって増強され、そのアクティブーター化合物が宿主細胞における関心あるタンパク質の発現を増加させることを特徴とする方法を提供する。本方法は、(a) 上記シス作動性活性化エレメントを含むデオキシ組織構築物を提供するステップと、(b) 上記アクティブーター化合物を結合し、関心あるタンパク質の発現を低減させるのに十分な量で、上記デオキシ構築物を上記宿主細胞に導入するステップとを含む。

【0020】

さらに、本発明は、宿主細胞における関心あるタンパク質の発現を増加させる一般的な方法であって、関心あるタンパク質の転写が、リプレッサー化合物を結合するシス作動性リプレッサーエレメントによって低減され、そのリプレッサー化合物が上記宿主細胞における上記関心あるタンパク質の発現を低減させることを特徴とする方法を提供する。本方法は、(a) 上記シス作動性活性化エレメントを含むデオキシ組織構築物を提供するステップと、(b) 上記リプレッサー化合物を結合し、上記関心あるタンパク質の発現を増加させるのに十分な量で、上記デオキシ構築物を上記宿主細胞に導入するステップとを含む。

【0021】

本発明の前述の態様および他の態様を、本明細書の図面および以下に記載の明細書におい

(12)

JP 2004-307250 A 2004.3.11

て、さらに詳細に説明する。

【0022】

【好適な実施形態の詳細な説明】

本明細書で使用する用語「植物」は、維管束植物を指す。代表的な植物としては、トウモロコシ (*Zea mays*)、カンナ (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), アルファルファ (*Medicago sativa*)、コムギ (*Oryza sativa*)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、ライムギ (*Secale cereale*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*)、ヒマワリ (*Helianthus annuus*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、ダイズ (*Glycine max*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ピーナツ (*Arachis hypogaea*)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、サツマイモ (*Ipomoea batatas*)、キャッサバ (*Manihot esculenta*)、コーヒー (*Coffea* spp.), ココナツ (*Cocos nucifera*)、パイナップル (*Ananas comosus*)、柑橘類の植物 (*Citrus* spp.), (*Theobroma cacao*)、チャ (*Camellia sinensis*)、バナナ (*Musa* spp.), アボカド (*Persea americana*)、イチジク (*Ficus carica*)、グアバ (*Psidium guajava*)、マンゴー (*Mangifera indica*)、オリーブ (*Olea europaea*)、パパイヤ (*Carica papaya*)、カシユー (*Anacardium occidentale*)、マカダミア (*Macadamia integrifolia*)、アーモンド (*Prunus amygdalus*)、テンサイ (*Beta vulgaris*)、リンゴ (*Malus pumila*)、クワ (*Rubus*)、イチゴ (*Fragaria*)、クルミ (*Juglans regia*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、アンズ (*Prunus armeniaca*)、サクランボ (*Prunus*)、モモ (*Prunus persica*)、プラム (*Prunus domestica*)、セイヨウナシ (*Pyrus communis*)、スイカ (*Citrullus vulgaris*)、ウキクサ (*Lemna*)、カラシ (*Brassica campestris*)、キャベツ (*Brassica capitata*)、カリフラワー (*Brassica oleracea*)、セロリ (*Apium graveolens*)、ナス (*Solanum melongena*)、アスパラガス (*Asparagus officinalis*)、オクラ (*Abelmoschus esculentus*)、サヤインゲン (*Phaseolus vulgaris*)、ライマメ (*Phaseolus limensis*)、エンドウ (*Lathyrus* spp.), ウリ属のメンバー、たとえば、ハバードカボチャ (*C. Hubbard*)、パターナットカボチャ (*C. moschata*)、ズッキーニ (*C. pepo*)、ヘチマカボチャ (*C. crookneck*)、*C. argyrosperma*, *C. a* 40 *argyrosperma* ssp. *sororia*, *C. digitata*, *C. esculentaria*, *C. foetidissima*, *C. lundelliana*, および *C. martinii*, およびキュウリ属のメンバー、たとえば、キュウリ (*Cucumis sativus*)、カンタループ (*C. cantalupensis*)、およびマスキメロン (*C. melo*) などがある。観賞用植物としては、アザレア (*Rhododendron* spp.), アジサイ (*Macrophylla hydrangea*)、ハイビスカス (*Hibiscus rosas-nensis*)、バラ (*Rosa* spp.), チューリップ (*Tulipa* spp.), ランパシイセン (*Narcissus* spp.), ペチュニア (*Petunia hybrida*)、カーネーション (*Dianthus caryophyllus*)、ボインセチア (*Euph* 50

(13)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

orbica pulcherima)、およびキナなどがある。本発明の実施に際して使用することが可能な針葉樹としては、たとえば、テゲマツ (*Pinus taeda*)、エリオットマツ (*Pinus elliotii*)、ボンダローサマツ (*Pinus ponderosa*)、コントルマツ (*Pinus contorta*)、およびモンテレーマツ (*Pinus radiata*) 等のマツ; ペイマツ (*Pseudotsuga menziesii*); ペイツガ (*Tsuga canadensis*); ペイトウヒ (*Picea glauca*); アカスギ (*Sequoia sempervirens*); ヨーロッパモミ (*Abies amabilis*) およびバルサムモミ (*Abies balsamea*) 等のモミ類; およびベイスギ (*Thuja plicata*) およびアラスカヒノキ (*Chamaecyparis nootkatensis*) 等のシダー類などがある。芝生としては、ノシバ、コマカグサ、ウシノケグサ、イチゴツナギ、イヌシバ、バツアローグサ、ライグラスおよびオーチャードグラスなどがあるがその限りではない。主として実験モデルの役割を果たす植物、たとえば、シロイヌナズナも含まれる。本方法で使用するための好ましい植物としては、マメ類、ナス科に属する種 (たとえば、トマト)、レタスおよびキャベツ等の葉菜類、芝生、および農産物植物 (たとえば、タバコ、コムギ、モロコシ、オオムギ、ライムギ、コム、トウモロコシ、ワタ、キャッサバ、等)、および実験用植物 (たとえば、シロイヌナズナ) などがある (がその限りではない)。任意の植物を使用して、本発明を実施することが可能であるが、タバコ植物が特に好ましい。

[0023]

本発明の植物から取集 (たとえば、切断または収獲) することができる植物の部分としては、たとえば、果実、花、種子、根、塊茎、葉、茎、樹皮、木部等がある。植物中の、増加されるまたは低減されるある特定のタンパク質に言及するとき、そのタンパク質の量は、植物の全体にわたって変化してもよく、または植物のある特定の部分に限って変化してもよいことに留意されたい。

[0024]

概して、本発明の説明に役立つ実施形態では、タバコ植物中で、ニコチン酸およびN-メチルピロリニウムカチオンの縮合によって、ニコチンが産生される。ニコチンが産生される結果となる生合成経路を、図1に示す。二つの制御遺伝子座 (*Nic1* および *Nic2*) は、ニコチン産生の相互優先 (codominant) 制御因子の役割を果たす。単一の *Nic* 突然変異体および二重の *Nic* 突然変異体の根の酵素分析から、二つの酵素、キノレートホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPTase) および腐敗メチルトランスフェラーゼ (PMTase) の活性は、ニコチン生合成レベルに正比例することがわかる。ニコチン合成に関して異なる能力を有するタバコ組織 (根およびカルス) における酵素活性の比較から、QPTase 活性および PMTase 活性は、ニコチン含量と厳密に相関関係があることがわかる (Wagner and Wagner, *Planta* 165: 532 (1985))。Saunders and Bush (*Plant Physiol* 64: 236 (1979)) は、低ニコチン突然変異体の根における QPTase レベルは、葉におけるニコチンレベルと比例することを示した。

[0025]

本発明は、1つの好適な実施形態において、単離された核酸 (たとえば、配列番号1またはそのフラグメントであって、該フラグメントは、望ましくは少なくとも連続した20~450個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも連続した30~400個のヌクレオチド、より好ましくは連続した50~350個のヌクレオチド、最も好ましくは連続した100~300個または200~400個のヌクレオチドからなる) に基づく。その単離された核酸は、植物キノレートホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPTase) および腐敗メチルトランスフェラーゼ (PMTase) コード配列の上流に存在する少なくとも1つのシス作動性制御エレメントであるか、またはかかる少なくとも1つのシス作動性制御エレメントを含む。もう1つの例は、米国特許第5,459,252号 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に開示されている配列から得られる *Nic* 遺伝子座

(34)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

物応答エレメントである。幾つかの実施形態では、上記Nic遺伝子産物応答エレメントは、NtQPT1プロモーターの-1000から-600または-700bpまでの間にある。従って、幾つかの実施形態は、米国特許第5,459,252号に開示されている、NtQPT1プロモーターの-1000から-600または-700までの間の配列に対応する300-400ヌクレオチド長のフラグメントを含む。

[0026]

従って、幾つかの実施形態では、具体的に示された核酸は、QPTaseおよび/またはPMaseの転写開始に同調する、1つ以上の転写因子(たとえば、Nic1およびNic2)との相互作用を促進する構造を有する。従って、上記核酸は、少なくとも1つの転写因子(たとえば、Nic1およびNic2)結合性配列である、または少なくとも1つの転写因子結合性配列を含むといわれ、「シス作用性制御エレメント」とも呼ばれる。こうしたシス作用性制御エレメント(たとえば、Nic1および/またはNic2と相互に作用する配列)の多数のコピーを植物細胞内に導入することにより、転写因子が、標的遺伝子(たとえば、QPTase遺伝子および/またはPMase遺伝子)の転写を開始する能力を低減させるか、または抑えることができる。

[0027]

QPTase活性およびPMase活性は、ニコチン含量と厳密に相関関係があるため、上述のような、植物の根におけるQPTaseレベルまたはPMaseレベルが(野生型植物におけるレベルと比較して)低下しているトランスジェニックタバコ植物を構築することにより、低減されたレベルのニコチンを有する植物が生じる結果となる。特定の理論に縛られることなく、減少された量のニコチンを有するタバコ植物、タバコ、およびタバコ製品を産生することにより、低減された量のTSNAも有すると思われる。TSNA形成のためのアルカロイド基質が効果的に除去される。タバコ中のニコチンの減少は、TSNAの減少と直接関連していることが判明した。意外なことに、本明細書に記載の方法は、常習性の可能性が低減されたタバコを産生するばかりではなく、同時に、発癌性の可能性が低いタバコを産生する。

[0028]

語句「低減された量」は、低減されたニコチンおよび/またはTSNAに関して、トランスジェニックにされていない同一種のタバコから、同じ方式で加工されたタバコ植物、タバコ、またはタバコ製品に存在するであろう量より少ない、トランスジェニックタバコ植物、タバコ、またはタバコ製品におけるニコチンおよび/またはTSNAの量をいうことを強調すべきである。従って、状況によっては、本明細書に記載の創意に含む方法でニコチンおよび/またはTSNAの低減が導かれているかどうかを判定するための対照として、同じ方式で加工された同一種の野生型タバコが使用されることもある。

[0029]

野生型タバコ種は、種類およびそれが成長した、収穫された、また保存処理された方式によって、TSNAおよびニコチンの量が有意に変化する。たとえば、バレータバコの葉は、30,000百万分率(ppm)のニコチンおよび8,000十億分率(ppb)のTSNAを有し、火力乾燥バレーの葉は、20,000ppmのニコチンおよび300ppbのTSNAを有し、保存処理した東洋タバコの葉は10,000ppmのニコチンおよび100ppbのTSNAを有する。本発明による、低減された量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコ植物またはその一部は、検出可能なニコチンおよび/またはTSNAを有しないこともあり、あるいは、ニコチンおよび/またはTSNAの量が同一種の対照植物に存在する量より少ない限り、幾らか検出可能な量の、1つ以上のTSNAおよび/またはニコチンを含んでもよい。すなわち、低減された量のニコチンを有する、本発明の実施形態によるバレータバコの葉は、0~30,000ppmのニコチンおよび0~8,000ppbのTSNA、望ましくは0~20,000ppmのニコチンおよび0~6,000ppbのTSNA、より望ましくは0~10,000ppmのニコチンおよび0~5,000ppbのTSNA、好ましくは0~5,000ppmのニコチンおよ

(35)

JP 2004-507290 A 2004.3.11

0~4, 0.00 p p b の T S N A、より好ましくは 0~2, 500 p p m のニコチンおよび 0~2, 000 p p b の T S N A、最も好ましくは 0~1, 000 p p m のニコチンおよび 0~1, 000 p p b の T S N A を有してもよい。本明細書に記載の方法で産生されるバレーの葉の実施形態は、0~1000 p p m のニコチンおよび 0~500 p p b の T S N A を有してもよく、本明細書に記載の方法で産生されるバレーの葉の残りの実施形態は、検出可能な量のニコチンまたは T S N A を実質的に有しない。

【0030】

同様に、低減された量のニコチンを有する、本発明の火力乾燥タバコの葉の実施形態は、0~20, 000 p p m のニコチンおよび 0~300 p p b の T S N A、望ましくは 0~15, 000 p p m のニコチンおよび 0~250 p p b の T S N A、より望ましくは 0~10, 000 p p m のニコチンおよび 0~200 p p b の T S N A、好ましくは 0~5, 000 p p m のニコチンおよび 0~150 p p b の T S N A、より好ましくは 0~2, 500 p p m のニコチンおよび 0~100 p p b の T S N A、最も好ましくは 0~1, 000 p p m のニコチンおよび 0~50 p p b の T S N A を有してもよい。本明細書に記載の方法で作製される乾燥処理したタバコの実施形態は、0~500 p p m のニコチンおよび 0~25 p p b の T S N A を有することもでき、本明細書に記載の方法で作製される乾燥処理したタバコの残りの実施形態は、検出可能な量のニコチンまたは T S N A を実質的に有しない。

【0031】

さらに、減少された量のニコチンを有する、本発明の保存処理した東洋タバコの実施形態は、0~10, 000 p p m のニコチンおよび 0~100 p p b の T S N A、望ましくは 0~7, 000 p p m のニコチンおよび 0~75 p p b の T S N A、より望ましくは 0~5, 000 p p m のニコチンおよび 0~50 p p b の T S N A、好ましくは 0~3, 000 p p m のニコチンおよび 0~25 p p b の T S N A、より好ましくは 0~1, 500 p p m のニコチンおよび 0~10 p p b の T S N A を有してもよく、最も好ましくは 0~500 p p m のニコチンを有し且つ T S N A を全く有しない。本明細書に記載の方法で作製される保存処理した東洋タバコの実施形態は、0~250 p p m のニコチンを有し且つ T S N A を全く有しなくてもよく、また、本明細書に記載の方法で作製される保存処理した東洋タバコの残りの実施形態は、検出可能な量のニコチンまたは T S N A を実質的に有しない。

【0032】

本発明は、このようなトランスジェニック植物を生じさせるための方法および核酸構築物、ならびにこのようなトランスジェニック植物を提供する。このような方法は、ニコチン生成を低減させる（または排除する）トランスジェニックカセットの開発を含む。ニコチン生成において制御を受けている Q P T a s e および P M T a s e（これらに限定されない）をコードする遺伝子のプロモーターに由来する、適切な数の DNA 配列（シス作動性エレメント）を用いて、タバコ植物を形質転換する。これらのシス作動性エレメントは、代々トランスファすることが可能なように、植物ゲノムに組み込まれることが好ましい。一般に、これらのシス作動性 DNA 配列と相互に反応する N i c 1 および N i c 2 DNA 結合性タンパク質は、比較的低レベルにて細胞で発現され、従って、適切なトランスジェニックシス作動性エレメントは、Q P T a s e および P M T a s e（これらに限定されない）をコードする遺伝子と結合した内因性エレメントと、利用可能な N i c 1 および N i c 2 に関して競合する。従って、これらのシス作動性 DNA 配列（および他のシス作動性エレメントのもの）を、本明細書では「デコイ」、または「分子デコイ」と呼ぶ。このような競合は、トランス作動性 DNA 結合性タンパク質が、同起源のシス作動性エレメントと占有する可能性を低下させ、それによってニコチン生成代謝物の合成をダウンレギュレーションする。

【0033】

本発明は、Q P T a s e または P M T a s e のシス作動性エレメントの DNA 分子、およびこれらの DNA 分子を含むベクター、ならびにこれらの DNA 分子およびベクターで形

(16)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

質転換されたトランスジェニック植物細胞および植物も提供する。本発明のトランスジェニックタバコ細胞および植物は、形質転換されていない対照タバコ細胞および植物より低いニコチン含量を特徴とする。

【0034】

ニコチン産生が低レベルであるかまたは実質的にニコチンを産生しないタバコ植物は、医薬、化粧品成分、または食品添加物等の商業的に価値がある産物を発現する導入遺伝子のレシビエントとして魅力的である。タバコは、遺伝子操作が容易であり、また1ヘクタール非常に多くの生物体量を生産することができるため、望ましい産物をコードする導入遺伝子のレシビエント植物として魅力的であり、ニコチン産生に貢献する資源が少ないタバコ植物は、従って、導入遺伝子産物の産生に有効な資源をより多く有する。所望の産物を生産する導入遺伝子を用いて、タバコを形質転換する方法は、当該技術分野において既知であり、任意の適当な技術を用いて、本発明の低ニコチンタバコ植物と共に使用することが可能である。

【0035】

低減されたQPaseおよびPMTase発現および/または低減されたニコチンレベルを有する、本発明のタバコ植物は、低減されたニコチン含量および/またはTSNA含量を有するタバコ製品の製造に望ましい。本明細書に記載のタバコ植物は、従来の成長技術および収穫技術（たとえば先端を切り取るまたは先端を切り取らない、花を刈り取るまたは花を刈り取らない、肥料が豊富な土壌または無肥料での栽培）に好適であり、また収穫された葉および茎は、葉タバコ、刻みタバコ、またはカットタバコを含む任意の形で、パイプ、シガロ、およびシガレットタバコ、および噛みタバコを含むがその限りではない伝統的なタバコ製品で使用するのに好適である。

【0036】

様々な量のニコチンおよび/またはニトロソアミン類を含む喫煙用のタバコ製品を作るために、本明細書に記載の低ニコチンおよび/またはTSNAタバコを加工して、従来のタバコとブレンドすることも予想される。消費者を、高ニコチンおよびTSNA製品から低ニコチンおよびTSNA製品に徐々に移行させるために、これらのブレンドされたタバコ製品を、タバコ製品中止プログラムに使用することができる。たとえば、喫煙者は、ニコチン10mgおよびニトロソアミン1.5mgを有するブレンドシガレットを喫煙するプログラムを開始し、ニコチン7mgおよびニトロソアミン1mgを含むシガレットの喫煙に徐々に移行し、続いてニコチン5.0mgおよびニトロソアミン0.5mgを有するシガレット、続いてニコチン2.0mgおよびニトロソアミン0.25mgを有するシガレット、続いて、ニコチンおよびニトロソアミン類を実質的に含まないシガレットのみを喫煙するか、または喫煙を全くやめると消費者が決定するまで、ニコチン1.0mgを有しTSNAを含まないシガレットに移行する。従って、本明細書に記載のブレンドシガレットは、ヒトにおける発癌性の可能性を段階的に低減させるためのアプローチの基礎を提供する。

【0037】

【1. Nic遺伝子産物応答エレメント等の、シス作用性エレメントをコードする核置】  
本発明の実施に際して、本発明の個々の用途に応じて、様々なシス作用性エレメントのいずれかを使用してもよい。本発明の実施に際して、単独または互いに組み合わせて使用することが可能なシス作用性エレメント（および対応する転写因子）の例としては、AS-1およびASF-1（米国特許第4,990,607号および第5,223,419号参照）、AAT反復エレメントおよびPABF（米国特許第5,834,236号および第6,191,258号参照）、ジャガイモ由来の傷害応答性シス作用性エレメント（Siebert et al., Plant Cell 1:961-8 (1989)）、インゲン由来の圧伸異性シス作用性エレメント（Bustos et al., Plant Cell 1:839-853 (1989)）、タバコRB7プロモーター由来の損傷に特異的なシス作用性エレメント（米国特許第5,459,252号およびYamamoto et al., Plant Cell 13:371382 (1991)）、陽性poly 30



(17)

JP 2004-507250 A 2004.9.11

(dA-dT) 制御エレメントおよび結合性タンパク質および陰性CCCCAA反復エレメントおよび結合性タンパク質 (Wang et al., Mol. Cell Biol. 12:3399-3406 (1992))、タバコのタバココフィトクロムA1プロモーター由来の根先抑制エレメント (Adam et al., Plant Mol Biol 1993:983-993 (1995))、トウモロコシシリセルアルデヒド三リン酸脱酸素酵素4遺伝子由来の酸素生活応答性エレメント (Geffers et al., Plant Mol Biol 43:11-21 (2000))、およびArabidopsis oleosin遺伝子由来の種子特異的調節領域 (米国特許第5,792,922号参照) (これらの全てを、引用することにより本明細書の一部をなすものとする) など挙げられるが、その限りではない。

[0038]

本技術の現状は、同定されたシス作用性調節領域 (たとえば、およそ1,340の記載があるPlant cis-acting Regulatory elements, 「PLACE」(<http://www.dna.affrc.go.jp/hotdocs/PLACE/>参照)、およびおよそ159の植物プロモーターを取載した、Plant Cis-acting Regulatory Elements 「PlantCARE」(<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/>参照) が大きいデータベースに取載されている状態である。これらのデータベースに取載されたシス作用性制御エレメント、およびRaumbauts et al., Nucleic Acids Research 27:295-296 (1999)、およびHigo et al., Nucleic Acids Research 27:297-300 (1999) に提供されているシス作用性制御エレメントを、本発明の実施形態と共に使用することができる。従って、上記データベースおよび参考文献を引用することにより本明細書の一部をなすものとする。本発明の実施形態と共に使用することができるシス作用性調節領域のさらなる例を以下に挙げる: Lacombe E, Van Doorselaere J, Boerjan W, Boudet AM, Grima-Pettenati J, シンナモイルCoA還元酵素遺伝子の維管束発現およびタンパク質とDNAとの複合体形成に必要なシスエレメントの特性決定 Plant J 23:663-676 (2000); Tilly JJ, Allen DW, Jack T Arabidopsis floral organ identity遺伝子AP ETALAS3のプロモーターにおけるCARGボックスは、多様な制御作用を介する Development 125:1647-1657 (1998); Cordes S., Deikman J., Margossian L. J., Fischer R. L., 発生の制御されるDNA結合性因子と、トマト由来の二つの異なる果実成熟遺伝子に調節する部位との相互作用 Plant Cell 1(10):1025-1034 (1989); Hagen G., Martin G., Li Y., Guilfoyle T., トランスジェニックタバコ植物における、ダイズGH3プロモーターのオーキシン誘導性発現 Plant Mol. Biol. 17:567-569 (1991); Pastuglia M., Roby D., Dumas C., Cock J. M., Brassica, oleraceaにおけるS遺伝子ファミリー受容体キナーゼの、傷害および細菌感染による急速な誘導 Plant Cell 9:11-13 (1997); Grierson C. Du JS, Zabala MT, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M 別個のシス配列およびトランス因子がジャガイモ塊茎貯蔵タンパク質遺伝子の代表的制御および発生の制御を指令する Plant J 5:815-826 (1994); MBSI, フラボノイド生成関連遺伝子制御に同様のPetunia hybrida MYB結合部位、Koeber R. E., S. Pelt C. E., van Den Elzen P. J. M., Mol J. N. M., Petunia hybridaのカルコンシンターゼ多重遺伝子族のクローニングおよび分子の特性決定、遺伝子 81:245-257 (1989); Inaba T., Nagano, Y., Sakakibara T., Sasaki Y., エンドウ 50

(18)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

GTPase遺伝子 *pra2* のフィトクロムダウンレギュレーション発現に関連するシス制御エレメントの同定, *Plant Physiol.* 120:491-499 (1999); DBE, 脱水素、低温、塩ストレスに関連する *Arabidopsis thaliana* 作動性エレメント, *Yamaguchi Shinozaki K., Shinozaki K.*, 二つの乾燥応答性 *rd29* 遺伝子をコードする *Arabidopsis* の DNA, *Plant Physiol.* 101:1119-1120 (1993); Rushton P. J., Torres J. T., Parniske M., Werner P., Hahlbrock K., Somssich I. E., エリナー誘導性 DNA 結合性タンパク質と、バセリ PRI 遺伝子のプロモーターにおけるエリナー応答エレメントとの相互作用, *EMBO J.* 15 (20): 5690-5700 (1996); 細胞周期制御に関連する MSA 様シス作動性エレメント, Ito M., Crique M. C., Sakabe M., Ohno T., Hata S., Kouchi H., Hashimoto J., Fukuda H., Komamine A., Watanabe A. 同調培養における A 型および B 型植物サイクリン遺伝子の細胞周期制御, *Plant J.* 11:983-992 (1997) (これら全てを、引用することにより本明細書の一部をなすものとする)。概して、宿主細胞の生命維持に重要ではない (たとえば、基本的な細胞機能に不可欠な「ハウスキープング遺伝子」と関連していない) が、植物に非致命的な表現型の変化をもたらす結果となる遺伝子または遺伝子ファミリーの転写制御と機能的に関連したエレメントが好ましい。

【0039】

Nic 遺伝子産物応答エレメントは、本明細書の記載と同じ方式で Nic 遺伝子産物により転写的に活性化される遺伝子のプロモーター領域をスクリーニングすることによって単離することができ、または、本明細書に記載の配列番号 1 にハイブリダイズし、続いて、以下に記載の方式で Nic 遺伝子産物を結合できる能力をスクリーニングすることにより同定することができる。

【0040】

本発明の実施に際して使用される核酸配列は、配列番号 1 またはそのフラグメントと配列類似性を有する天然または合成のフラグメントを含む。そのフラグメントは、望ましくは、少なくとも連続した 20~455 個のヌクレオチド、好ましくは、少なくとも連続した 30~400 個のヌクレオチド、より好ましくは、連続した 50~350 個のヌクレオチド、最も好ましくは、連続した 100~300 個または連続した 200~400 個のヌクレオチドからなる。この定義は、配列番号 1 の DNA または上記フラグメントの、天然の対立遺伝子の変異を含むことを意図する。従って、本発明の実施に際して、配列番号 1 の DNA、またはその相補鎖にハイブリダイズする DNA 配列も使用することが可能である。好適な実施形態は、配列番号 1 のフラグメント、または Nic 遺伝子産物を結合できる能力を保持した他の Nic 遺伝子産物応答エレメント (すなわち、配列番号 1 の相補鎖に結合するエレメント) を含む。このようなフラグメントは、概して、少なくとも 20、40 または 60 ヌクレオチドの長さである天然の標識物の、連続したフラグメントまたは一部である。配列番号 1 と配列類似性を有する他の DNA 配列を容認する条件は、通常の方式で決定することができる。たとえば、このような配列のハイブリダイゼーションは、低ストリンジエンシーの条件下で実施してもよく、またはさらにストリンジエンシーの条件下で実施してもよい (たとえば、標準 *in situ* ハイブリダイゼーションアッセイを使用すると、本明細書に配列番号 1 として示されている配列を有する DNA に対して、60℃ またはさらに 70℃ にて、0.3M の NaCl、0.03M のクエン酸ナトリウム、0.1% の SDS の洗浄ストリンジエンシーで要される条件。J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2版, 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory参照))。概して、このような配列は、本明細書に配列番号 1 として示されている配列と、少なくとも 65% 類似、75% 類似、80% 類似、85% 類似、90% 類似、または 95% も、またはそれ以上類似している。配列類似性の決定は、最大マッチングを得るために 50

(19)

JP 2004-307250 A 2004.3.11

列させた二つの配列を用いて行った。マッチングを最大化する際に、マッチさせる2配列のいずれでも、ギャップが許容される。10以下のギャップ長さが好ましく、5以下のギャップ長さがより好ましく、2以下のギャップ長さが、なおいっそう好ましい。

【0041】

本発明のDNA配列は、本明細書に記載の配列（配列番号1）、または対立遺伝子またはこれらの遺伝子の多形変異形を示す等価ヌクレオチド配列、またはそのコード領域から実質的に修飾されてもよい。

【0042】

本明細書および請求の範囲における語句「実質的な配列類似性」の使用は、本明細書に開示され、また請求の範囲に記載されている実際の配列からの、僅かで、重要ではない配列の変化を有するDNA、RNAまたはアミノ酸配列は、本発明の配列と等価であると考慮されることを意味する。この点に関して、「僅かで、重要でない配列変化」は、「類似した」配列（すなわち、本明細書に開示され、また請求の範囲に記載されている、DNA、RNA、またはタンパク質と実質的な配列類似性を有する配列）が、本明細書に開示され、また請求の範囲に記載されている配列と機能的に等価であることを意味する。機能的に等価の配列は、本明細書に開示され、また請求の範囲に記載されている、核膜およびアミノ酸組成物と実質的に同様に作用し、実質的に同じ組成物を生じさせる。

【0043】

本発明の図様と共に使用するためのさらなる核酸配列は、米特許第5,459,252号（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に開示されている配列から得ることができるNic遺伝子産物応答エレメントを含む。幾つかの実施形態では、Nic遺伝子産物応答エレメントは、NtQPT1プロモーターの-1000から-600または-700bpまでの間にある。従って、幾つかの実施形態は、米特許第5,459,252号に開示されている-1000から-600または-700までの間のNtQPT1プロモーターの配列に対応する、NtQPT1プロモーターの300~400ヌクレオチド長のフラグメントを含む。

【0044】

前述の通り、本明細書に記載のDNA配列を、様々な宿主細胞に形質転換することができる。望ましい成長特性および取扱特性を有する様々な好適な宿主細胞は、当該技術分野において容易に入手できる。

【0045】

本明細書および請求の範囲における、「単離された」または「実質的に純粋な」という語句のDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質の変異因子(modifier)としての使用は、そのように明示されたDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質が、人間の努力によって、それらのin vivo細胞環境から分離されていることを意味する。本明細書で使用する、「生来のDNA配列」または「天然のDNA配列」は、非トランスジェニック細胞または組織から単離することができるDNA配列を意味する。生来のDNA配列は、位置指定突然変異縁縁等によって、人工的に変化させていないものである。いったん生来のDNA配列が同定されると、生来のDNA配列を有するDNA分子を化学的に合成するか、または当該技術分野で既知の組織とDNA手順を使用して生じさせることができる。本明細書で使用する、生来の植物DNA配列は、非トランスジェニック植物細胞または組織から単離することができるものである。本明細書で使用する生来のタバコDNA配列は、非トランスジェニックタバコ細胞または組織から単離することができるものである。

【0046】

【2. 核膜構築物およびトランスファクター】

本発明の核膜構築物または「カセット」は、一般に、上述のNic遺伝子産物応答エレメント等のシス作用性エレメントを、組織構築物として、Nic遺伝子産物を植物細胞に導入するためのトランスファクターの役割を果たす線状または環状の核酸の中を含む。

(20)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

[0047]

この構築物またはカセットは、少なくとも1つの複製システムも有するDNA構築物で提供することも可能である。便宜上、Escherichia coliで機能する複製システム、たとえば、ColE1、pSC101、pACYC184等を有することがよくある。この方式では、各操作後の各段階で、結果として生じる構築物をクロニングし、配列決定し、さらに操作の正確さを決定することが可能である。加えて、または、coli複製システムの代わりに、P-1不適合性(P-1 incompatibility)プラスミドの複製システム、たとえば、pRK290等の広い宿主範囲の複製システムを使用してもよい。複製システムに加えて、1つ以上の宿主で、または個々の宿主の異なるマーカーで有用な可能性がある、少なくとも1つのマーカーが存在する場合が多い。<sup>10</sup> すなわち、原核宿主の場合、1つのマーカーを選択して使用することができるが、真核宿主、特に植物宿主の場合、もう1つのマーカーを選択して使用することができる。マーカーは、抗生物質、毒素、重金属等の殺生物剤に対する保護であってよく、栄養要求性宿主に原形質性を与えることにより補充性を提供してもよく、また、植物における新規な化合物の産生を介して可視表現型を提供することが可能である。

[0048]

Thompsonらに付与された米国特許第5,773,689号、Thompsonらに付与された第5,773,695号、Michalowskiらに付与された第6,245,974号、Thompsonらに付与された第6,239,328号、Thompsonらに付与された第6,100,448号、およびThompsonらに付与された第6,037,525号(引用することにより本明細書の一部をなすものとする)らに記載の通り、本発明の核膜構築物は、その安定性および/または遺伝性を高めるために、シス作用性エレメントに5'、3'、または5'と3'の両方が配置された1つ以上のマトリックス付着領域を含んでもよい。

[0049]

適切な複製システムの制限酵素切断、および利用可能な部位への、特定の構築物またはフラグメントの挿入により、様々な構築物、カセット類、マーカー類を含む様々なフラグメントを、連続的に導入することが可能である。ライゲーションおよびクロニングの後、さらなる操作のために、DNA構築物を単離することが可能である。J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2版, 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory) により例示される通り、これらの技術は全て、文献に詳細に例示されている。

[0050]

本発明の核膜構築物が植物組織を形質転換するのに使用することが可能なベクターとしては、弾道的ベクターおよびアグロバクテリウムベクターの両者、ならびに、DNA媒介形質転換に適したベクターなどがある。これらは、以下で詳細に検討する。

[0051]

本発明の形質転換された細胞および植物を作るために使用される核膜構築物分子およびベクターは、優性の選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでもよい。タバコで使用するのに適した優性の選択可能なマーカーとしては、とりわけ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(NPTII)、ヒドロマイシンホスホトランスフェラーゼ(HPT)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)をコードする抗生物質抵抗性遺伝子などがある。タバコで使用するのに適した既知の優性の選択可能マーカーは、メトトレキサート抵抗性ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする突然変異体ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子である。適当な抗生物質抵抗性遺伝子を含有するDNAベクター、および対応する抗生物質は、市販されている。

[0052]

[3. 植物形質転換、再生および増殖]

適切な濃度の抗生物質(または通常は細胞に有毒な他の化合物)を含有する培地中に混合<sup>50</sup>

(21)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

細胞集団を入れることにより、既知の形質転換されていない細胞集団から形質転換された細胞を選択する（選択された優性の選択可能マーカー遺伝子産物が、それに対する抵抗性を与える）。従って、形質転換されている植物細胞のみが生き残り増殖する。

【0053】

本発明の組織培養植物を産生する方法は、一般に、先ず再生することができる植物細胞（一般に、再生することができる組織中にある植物細胞）を提供することを含む。次いで、この植物細胞を、（本明細書に記載の）本発明のカセットを含むDNA構築物で形質転換し、この形質転換された植物細胞から組織培養植物を再生させる。以下に説明する通り、胚芽カセットを担持する微粒子で植物細胞に衝撃を与えること、カセットを担持するTiプラスミドを含有する *Agrobacterium tumefaciens* に細胞を感染させること、またはトランスジェニック植物の作製に適した任意の他の技術を含むがその限りではない、当該技術分野で既知の技術によって形質転換するステップを実施する。

【0054】

本発明のDNA構築物を担持する微粒子であって、植物細胞の弾道的形質転換に適した微粒子も、本発明の形質転換された植物を作るのに有用である。この微粒子を植物細胞内に推進させて形質転換された植物細胞を作り、この形質転換された植物細胞から植物を再生させる。本発明の実施に際して、任意の好適な弾道的細胞形質転換方法および装置を使用することができる。代表的な装置および手順は、Sanford and Wolf に付与された米国特許第4,945,050号、およびChristouらに付与された米国特許第5,015,580号（全ての米国特許文庫を、引用することにより本明細書の一部分をなすものとする）に開示されている。弾道的形質転換手順を使用するとき、形質転換すべき細胞で複製することができるか、または形質転換すべき細胞に組み込むことができるプラスミドに、カセットを組み込んでよい。このようなシステムで使用するのに適した微粒子の例としては、1~5  $\mu\text{m}$  の金球などが挙げられる。任意の適当な技術、たとえば、沈降によって、この微粒子上にDNA構築物を付着させることができる。

【0055】

本発明の実施に際して有用な多数の *Agrobacterium* ベクターシステムが知られている。たとえば、米国特許第4,459,355号には、Tiプラスミドを含有する *Agrobacterium* 種を用いて、双子葉植物を含む感受性植物を形質転換する方法が開示されている。 *Agrobacterium* ベクターを用いた木質植物 (woody plant) の形質転換は、米国特許第4,795,855号に開示されている。さらに、Schilperoortらに付与された米国特許第4,940,838号には、本発明の実施に際して有用なバイナリーの *Agrobacterium* ベクター（すなわち、 *Agrobacterium* が、Tiプラスミドの *vir* 領域を有するがT領域を有しない1つのプラスミドと、T領域を有するが *vir* 領域を有しない第二のプラスミドを含むもの）が開示されている。

【0056】

一般に、高コピー数のデコイ配列がゲノムに存在しなければならないため、シス作動性エレメントのタンデムコピーを、 *Agrobacterium* ベクターに挿入することも可能であるが、好ましい植物の形質転換方法は、トランスジェニックDNAの多数のコピーを植物ゲノムに導入する、粒子衝撃による。本発明の細胞および植物で、増加されたレベムまたは低減されたレベムの関心あるタンパク質を得るために、宿主細胞（およびその子孫または娘細胞）に挿入しなければならないシス作動性エレメント（それぞれが、プラスミド等のベクター上に存在するかどうかにかかわらず、1つのベクターまたはプラスミド、またはそれらの組み合わせ上の多数のコピーを計数した）の実際の数は、個々のエレメントによってある程度異なるが、概して、少なくとも20、30または50~約500、1,000または2,000以上である。

【0057】

本発明のDNA構築物を用いた植物細胞プロトプラストのDNA併介形質転換、およびその後の、形質転換されたプロトプラストからの植物の再生によって、植物種を形質転換することが可能である。当該技術分野で既知の手順による、タバコプロトプラストとDNA

(22)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

含有リボソームとの融合またはエレクトロポレーションは、当該技術分野で既知である (Shillito et al., 「エレクトロポレーションを含む多数の方法による、双子葉植物および単子葉植物のプロトプラストへの直接遺伝子導入」、Methods in Enzymology 153, 313-36 (1987) )

[0058]

本明細書で使用する「形質転換」は、外因性DNAで安定に形質転換されたトランスジェニック細胞を作るための、外因性DNAの細胞への導入を指す。「安定に形質転換された」は、外因性核酸が、最初に形質転換された細胞の娘細胞または子孫細胞に伝達されること、好ましくは、形質転換された植物の子孫植物 (有性的および無性的に増殖された子孫植物を含む) に伝達されるか、または形質転換された植物の子孫植物によって受け継がれることを意味する。

[0059]

当該技術分野で既知の細胞および組織培養技術を利用して、形質転換された細胞を無傷の植物に再生させる。植物再生方法は、形質転換方法と適合するように選択する。形質転換された細胞からトランスジェニック植物を再生させた後、導入されたDNA配列は、過度の実験をせずに、従来の植物育種技術によって他の植物変種に移入される。

[0060]

たとえば、トランスジェニックDNAの分離を分析するために、再生させた形質転換植物 (R<sub>0</sub>) を成熟させ、関心あるタンパク質のレベルをテストし、自己増殖させてR<sub>1</sub>植物を生じさせる。トランスジェニックDNAを担持するR<sub>1</sub>植物の一部は、トランスジェニックDNAについてホモ接合性である。ホモ接合性R<sub>1</sub>植物を識別するために、トランスジェニックR<sub>1</sub>植物を成熟させ、自己増殖させる。ホモ接合性R<sub>1</sub>植物は、各子孫植物がトランスジェニックDNAを担持するR<sub>2</sub>子孫を産生し、ヘテロ接合性R<sub>2</sub>植物の子孫は、3:1で分離する。

[0061]

ニコチンはタバコ植物を病害虫による被害から保護するのに役立つ天然の殺虫剤の役割を果たす。従って、本方法で産生される低ニコチン植物または無ニコチン植物を、さらなる昆虫保護を与える導入遺伝子 (たとえば、*Bacillus thuringiensis*) で、さらに形質転換することが望ましいこともある。

[0062]

本発明で使用するのに好適な植物は、*Nicotiana* 属の任意の種、すなわち、*N. tabacum*、*N. rustica* および *N. glauca* を含む、タバコである。タバコのあらゆる種または変種を使用することが可能である。

[0063]

器官形成により、胚形成により、その後、その後のクローン増殖ができる任意の植物組織を、本発明のベクターを用いて形質転換してもよい。本明細書で使用する用語「器官形成」は、分裂組織の中心から苗木および根が順次発生する過程を意味し、本明細書で使用する用語「胚形成」は、体細胞から苗木、配子から苗木、苗木および根が胚嚢様式で一様に (順次ではない) 発生する過程を意味する。選択される個々の組織は、形質転換しようとしている種に利用でき、且つ最も適した、クローン増殖システムによって異なる。代表的な組織例としては、リーフディスク、花粉、胚、子葉、胚軸、カルス組織、既存の分裂組織 (たとえば、頂端分裂組織、腋芽、および根の分裂組織)、および除根された分裂組織 (たとえば、子葉分裂組織および胚軸分裂組織) などがある。

[0064]

本発明の植物は、様々な形態をとることができる。本植物は、形質転換された細胞と形質転換されていない細胞とのキメラであってもよい。本植物は、クローン形質転換体であってもよい (たとえば、全ての細胞が、本カセットを含有するように形質転換されている)。本植物は、形質転換された組織および形質転換されていない組織の移植片を含んでもよい (たとえば、根移植片における、未形質転換移植片に移植された形質転換根)、本発明の形質転換された植物は、様々な方法で、たとえば、クローン増殖または古典的育種技術

(23)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

で増殖させることが可能である。たとえば、第一世代（すなわちT1）形質転換植物を自己増殖させてホモ接合体第二世代（すなわちT2）形質転換植物を育い、このT2植物を古典的育種技術でさらに増殖させることができる。優性の選択可能マーカー（たとえば、*npt11*）を本発明の標識物と結び付けて、育種を支援することができる。

[0065]

本発明の幾つかの好適な実施形態では、変化したレベルのタンパク質を有するトランスジェニック植物を作るために、十分な数のデコイまたはシス作動性エレメントが細胞に挿入され、且つ多くの細胞分裂がされるあいだにわたって保持されることを確実にすることを助けるために、上述の銀粒子銃形質転換を使用し、上述のシス作動性デコイセグメントを輸送するために、環状のDNAまたはプラスミドを使用し、（使用される環状のDNAまたはプラスミドは比較的小さく、たとえば、10,000未満または6,000未満の塩基対からなる）、また高モル比のシス作動性エレメントと選択可能マーカー（たとえば、10対1）を宿主細胞内に挿入する。

[0066]

本明細書で使用する農産物は、園地と一緒に植えられた、本発明の、同一属の、複製の植物を含む。「園地」は、共通の耕地面または温室を意味する。従って、本発明は、同一種および変種形質転換されていない植物の類似した農産物に比べて、変化したレベルの関心あるタンパク質を有する（たとえば、*QPase*および*PMase*活性、従って低減されたニコチンレベルを有する）植物の農産物を産する方法を提供する。

[0067]

本発明は、トランスジェニックタバコにおけるニコチンレベルを低減させる方法について説明するが、この方法はまた、各ゲノムの遺伝子座をクロニングせずにトランス作動性転写アクティベーターおよびトランス作動性転写リプレッサーにおける表現型顕著の突然変異に使用することができる。転写因子に応答するプロモーターの領域を明確にするための、当業者が既知の技術を使用して、遺伝子のプロモーター領域を分析することができる。一般に、これは、プロモーターの欠失分析によって行われる。プロモーターのネステッド欠失（*nested deletion*）をレポーター遺伝子に融合させ、トランスジェニック生物におけるレポーター遺伝子の発現をモニタリングする。現在の技術を使用した転写因子の単離は非常に難しいが、1つ以上の転写アクティベーターによって同等に制御される遺伝子セットを混乱させることが望ましい用途では、本発明を使用することによって、同族転写因子をクロニングする必要性がなくなる。反対に、本発明の方法は、1つ以上の転写リプレッサーによって阻害制御される遺伝子セットの発現をアップレギュレーションする。

[0068]

上述の通り、*in vivo*でも*in vitro*でも、本発明を使用して、植物（特に単子葉植物および双子葉植物等の維管束植物）細胞、動物（とり、哺乳動物）細胞、表面細胞、または細菌細胞を含む、様々な宿主細胞で、遺伝子発現を混乱させ、シス作動性活性エレメントの調節にある関心あるタンパク質の発現をダウンレギュレーションすることも可能であろう。細菌および真菌において、多コピープラスミドを使用して、細胞内に存在する分子デコイのコピーを増加させることができる。

[0069]

以下の実施例は、例を挙げて本発明を説明するために記載するものであり、本発明を限定するものと考えてはならない。

[0070]

[実施例1]

[*NtQP1*プロモーターにおけるシス作動性エレメントの定位]

*NtQP1*シス作動性エレメントに必要な最小配列を特性決定するために、*NtQP1*遺伝子のプロモーター領域を単離し、5'末端で如脂し、 $\beta$ -グルクロナーゼ（*GU*）をコードする遺伝子に融合させて、ニコチン産生の特異的エンハンサーとしての機能を評価した。*NtQP1*遺伝子を単離し、配列決定した。*ToBRD2* cDNA配列

(24)

JP 2004-307250 A 2004.3.11

をゲノム遺伝子座配列と比較することによって、転写物の開始を決定した。転写開始点の5'に位置する配列を、プロモーター配列と定義した。PCRプライマーおよびプロモーターを鋳型として使用し、プロモーターの5'末端で切断を行って、最小のシス作用性エンハンサー配列を決定した(図2参照)。この切断部分を、GUSをコードするuidA遺伝子に融合した。この融合遺伝子をベクターに導入し、標準的な弾道形質転換方法で、*Nicotiana tabacum*バレー21に形質転換した。

【0071】

植物を、根、茎、および葉に分けることによって、GUS活性を評価した。異なるNtQPT1切断構築物で形質転換された各種植物組織を、乳鉢および乳鉢で粉碎し、NaPO<sub>3</sub>緩衝液、pH7.0でタンパク質を抽出し、X-Glc (100 μg/ml)を加え、37℃で30分間、分析を行った。595 nmにてGUS活性を測定した。構築物ごとに、少なくとも20の独立した形質転換体を分析した。平均値および標準偏差値を決定した。切断におけるGUS活性を、CaMV 35S-GUS融合体およびプロモーターレスGUS (pBI101) 対照と比較した。-586~-2000 bpをuidA遺伝子に融合させたとき、NtQPT1発現を示す最大GUS活性を得た(図3)。-1から-586までのより短いプロモーターは、高レベルのuidA発現を支持しなかった。従って、NtQPT1シス作用性エレメントは、転写開始点の-586~-2000 bp 5'に位置する。

【0072】

【実施例2】

[NtQPT1プロモーターにおけるNic遺伝子産物結合部位の定位]

uidAレポーター遺伝子(GUSをコードする)に融合したNtQPT1プロモーター欠失シリーズを、*nic*<sup>-</sup>/*nic*<sup>+</sup>ホモ接合性*N. tabacum*植物に形質転換した。1つの遺伝子座にトランスジュニクDNAを有するR<sub>2</sub>形質転換体を、*nic*<sup>-</sup>/*nic*<sup>+</sup>または*Nic*<sup>+</sup>/*Nic*<sup>+</sup>ホモ接合性植物と交雑させて、導入遺伝子(NtQPT1プロモーター-GUS)を同一染色体位置に担持するホモ接合性(*nic*<sup>-</sup>/*nic*<sup>-</sup>)子孫およびヘテロ接合性(*Nic*<sup>+</sup>/*nic*<sup>-</sup>)子孫を与えた。多数の、独立した形質転換体からの多数の子孫で、GUS活性を定量化し、*Nic*<sup>+</sup>変異型および*nic*<sup>-</sup>変異型の間で比較した(表1)。1.5より大きい比率を、Nic遺伝子産物活性化に適合するシス作用性エレメントを含むと決定した。

【0073】

【表1】



(25)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

表1. タバコにおける、Nic遺伝子産物による、NtQPT1プロモーターに指令されたGUS発現の抑制

プロモーター	独立した 形質転換体	Nic <sup>+</sup> /nic <sup>-</sup> における GUS活性	nic <sup>+</sup> /nic <sup>-</sup> における GUS活性	Nic <sup>+</sup> /nic <sup>-</sup> の GUS比
2.0(2010) <sup>1</sup>	2	111.7(7) 46.6(6)	21.2(4) 11.9(8)	5.3 5.6
1.3(1306) <sup>1</sup>	2	92.4(6) 93.9(7)	16.6(4) 12.9(5)	5.5 7.3
1.0(1042) <sup>1</sup>	3	55.7(5) 74.1(6) 78.0(5)	18.3(4) 27.5(7) 17.2(7)	3.0 2.7 4.5
734	1	5.5(5)	3.5(5)	1.5
586	3	47.55(5) 24.3(3) 29.1(33)	44.9(5) 16.0(36) 30.3(19)	1.06 1.5 0.97
535	3	71.6(10) 54.0(5) 51.9(5)	50.3(5) 40.7(3) 67.8(5)	1.4 1.3 0.8
CaMV 35S	4	32.7(4) 44.8(5) 54.8(5) 9.7(4)	19.6(4) 47.6(3) 40.6(6) 8.6(3)	1.7 0.94 1.3 1.1

GUS活性は、pmol MU/ $\mu$ gタンパク質/分として表した。<sup>1</sup>実際のプロモーターサイズ(bp)を、括弧内に示す。<sup>2</sup>括弧内の数値は試験した植物の数を示す。

[0074]

Nic<sup>+</sup>/nic<sup>-</sup>およびnic<sup>+</sup>/nic<sup>-</sup>植物におけるGUS活性で決定された通り、Nic遺伝子産物の結合は、NtQPT1プロモーターのおよそ1000bpと-600bpまたは-700bpとの間に位置することが、これらの実験からわかった。

[0075]

[実施例3]

【分子デコイを使用したNtQPT1遺伝子発現の抑制】

NtQPT1プロモーターの-1000bpと-600bpまたは-700bpとの間に位置するスクレオチド配列を、タンデムアレイ状で、植物-アグロバクテリウムシャトルベクターに挿入し、続いて、当業者に既知の方法でタバコに形質転換する。上記ベクターで安定に形質転換された植物を、NtQPT1の発現レベルおよびニコチンおよび/またはTSNA含量について評価する。これらの実験から、Nic遺伝子産物と相互に作用する分子デコイで形質転換されたタバコは、低減された量のニコチンおよび/またはTSNAを示すことがわかる。低減されたNtQPT1の発現および低減されたニコチンレベルを有する分子デコイの、多数のタンデム挿入物を含む植物は、商業的に価値がある産物の発現、および減少されたニコチンおよび/またはTSNA含量を有するタバコ製品の製造に使用される。

[0076]

[実施例4]

【TGACG分子デコイを使用したASF-1結合の抑制】

スクレオチド配列TGACGを、タンデムアレイ状で、植物-アグロバクテリウムシャトルベクターに挿入し、当業者に既知の方法で、エンドウ等の植物に形質転換する。上記ベクターで安定に形質転換された植物は、ヒストン遺伝子(Mikami et al., (1987) FEBS Lett. 223:273); アグロピン生合成のための酵素遺伝子

(25)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

伝子 (Velten et al., EMBO J. 3:2723-30)、オクトピンシンターゼ遺伝子 (Ellie et al., EMBO J. 6:3203)、およびマンニンシンターゼ遺伝子 (DeRita and Gelvin, (1987) Mol. Gen. Genet. 207:233)、ならびにCaMV35S遺伝子、ヒストンH3遺伝子およびノバリンシンターゼ遺伝子等の、植物遺伝子でみられる配列モチーフTACGCGを認識するトランス作動性DNA結合因子ASF-1の、低減された結合活性を有する。

【0077】

【実施例5】

【分子デコイを使用した、 $\beta$ -ファセオリンの空間的および時間的発現の制御】

$\beta$ -ファセオリン ( $\beta$ -phaseolin) 遺伝子のUAS1に対応するスクレオチド配列 (-295~-109) を、タンデムアレイ状で、植物-アグロバクテリウムシロバクテリウムに挿入し、当業者に既知の方法でインゲン植物に形質転換する。上記バクテリウムで安定に形質転換された植物は、UAS1に位置する配列CATGCAAAおよびCATGCATGを認識するトランス作動性DNA結合因子PvALFの、低減された結合活性を有する (Bobb et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25 (3):641-7)。PvALFの低減された活性を有する植物であれば、主として子葉および苗条分枝組織において、 $\beta$ -ファセオリンの種子特異的発現の低減された発現を示す (Bustos et al. (1991) EMBO J. 10 (6):1469-1479)。

【0078】

$\beta$ -ファセオリン遺伝子のビリンボックス (GCCACCTCAA; 配列番号2) および部位B (CACACCTCAA; 配列番号3) に対応するスクレオチド配列のタンデムアレイをインゲン植物に形質転換すると、結果として、 $\beta$ -ファセオリン発現の早熟開始につながるトランス作動性DNA結合因子ROM1およびROM2の結合活性が低減する。ROM1およびROM2タンパク質は、種子成熟の開始をブロックするための、 $\beta$ -ファセオリンおよびフィトヘマグルチニンレサプユニット発現のリプレッサーの役割を果たす (Bustosらに付与された米国特許第6,160,202号; Chem et al. (1996) Plant Cell 8:305-321; Chem et al. (1996) Plant J. 10:136-148)。

【0079】

【実施例6】

【分子デコイを使用した植物遺伝子発現の制御】

糖遺伝子をコードする、タバコRB7プロモーターからの根に特異的なシス作動性エレメントのタンデムアレイ (Conklingらに付与された米国特許第5,459,252号; Yamamoto et al. (1991) Plant Cell 12:339-340) で、タバコ植物を形質転換すると、結果として、RB7シス作動性エレメントのトランス作動性DNA結合因子の結合活性が低減する。

【0080】

同様に、以下のシスエレメントの類似したタンデムアレイを、植物に形質転換して、対応するトランス作動性DNA結合因子の結合活性を低減させる。AATTSシス作動性回復エレメントおよびその対応するPABFトランス作動性因子 (米国特許第5,834,236号および第6,191,258号参照); 陽性poly (dA-dT) 制御エレメントおよび結合性タンパク質および陰性CCAA回復エレメントおよび結合性タンパク質 (Wang et al. (1992) Mol. Cell Biol. 12:3399-3406); タバコのタバコフィトクロムA1プロモーター由来の根先端制御エレメント (Adam et al. (1995) Plant Mol. Biol. 29:983-993); トウモロコシシリルアルデヒドヒドロゲナーゼ4遺伝子由来の糖生調節エレメント (Gefferes et al. (2000) Plant Mol. Biol. 43:11-21); およびArabidopsis oleosin遺伝子由

(27)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

来の種子特異的調節領域 (米国特許第5,792,922号参照)。

[0081]

[実施例7]

[分子デコイを使用し生じさせた、低減されたニコチンおよび/またはTSNAレベルを有するタバコ]

Nt QPT1プロモーターのおよそ300または400ヌクレオチド長のフラグメント (たとえば、配列番号1等の、Nt QPT1プロモーターの-1000bpと-600bpまたは-700bpとの間に位置するヌクレオチド配列を含む) の多数のコピーを、植物細胞の弾道形質転換に適した微粒子 (たとえば、1~5μmの金球) に、(たとえば、沈降によって) 付着させる。形質転換された植物細胞を、この微粒子をタバコ植物細胞 (たとえば、バレー21 LA) 内に推進させ、この形質転換された植物細胞から植物を再生させる。バレー21 LAは、バレー21と比較して、大幅に低減されたレベルのニコチンを含むバレー21の変種である (すなわち、バレー21 LAは、バレー21のニコチンレベルの8%を有する、Legg et al, Can J Genet Cytol, 13: 287-91 (1971); Legg et al, J Hered, 60: 213-17 (1969)) 参照。

[0082]

任意の適当な弾道の細胞形質転換方法および装置を使用することができる。代表的な装置および手順は、Sanford and Wolfに付与された米国特許第4,945,050号、およびChristouらに付与された米国特許第5,015,580号 (その両者を引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に開示されている。任意選択的に、形質転換された核は、選択可能なマーカー (たとえば、形質転換体の陽性または陰性選択を可能にするマーカー) をコードする遺伝子を含んでもよく、または分子デコイを選択可能マーカー遺伝子と共に同時トランスファーしてもよい。この方式で、陽性の形質転換体を容易に鑑別することができる。

[0083]

形質転換された細胞、組織、および実生を、(選択可能マーカーを使用したかどうかによつて、選択化合物、たとえば、抗生物質を含むまたは含まない) Murashige-Skoog (MS) 培地で成長させる。バレー21 LAの独立した形質転換体 (T<sub>1</sub>) 100個を自己増殖させる。自己増殖した植物 (T<sub>1</sub>) の子孫を成長させる。微量分析技術を使用して、T<sub>1</sub> 子孫のニコチンレベルを定量的に測定する。およそ200mgの新鮮なタバコ葉を採取し、抽出溶液1ml中で粉砕する (抽出溶液: 100mlのH<sub>2</sub>O中に酢酸1ml)。ホモジネートを、14,000×gで5分間遠心分離し、上澄を静置した試験管に取り、以下の試薬を加える。100μlのNH<sub>4</sub>OAc (5g/100mlのH<sub>2</sub>O + 50μlのBrij 35)、500μlの臭化シアン (Sigma社製 C-638)、0.5g/100mlのH<sub>2</sub>O + 50μlのBrij 35、400μlのアニリン (100mlのNH<sub>4</sub>OAc + 50μlのBrij 35で緩衝化したアニリン0.3ml)。抽出溶液中に10mg/mlを含むニコチン標準ストック液を調製し、希釈して校正用標準シリーズを作る。450nmにおける吸光度を読み取り、標準検量線を使用して、被験サンプルのニコチン含量を決定する。

[0084]

バレー21 LA系のニコチンレベルの10%未満を有するT<sub>1</sub> 子孫を自己増殖させて、T<sub>2</sub> 子孫を生じさせる。氷で、ホモ接合性T<sub>2</sub> 子孫を固定する。ホモ接合性T<sub>2</sub> 子孫およびヘテロ接合性T<sub>2</sub> 子孫におけるニコチンレベルも、微量分析を使用して、定量的に決定する。ガスクロマトグラフィー/フレイムイオン化検出 (GC/FID) を使用したニコチンレベルの定量的分析のために、ホモ接合性T<sub>2</sub> 子孫の葉サンプルをSouthern Research and Testing Laboratory, Wilson, NCに送ってもよい。ホモ接合性T<sub>2</sub> 子孫は、形質転換されていないタバコ (たとえば、70ppm) と比較して、実質的に低減されたニコチンレベルを有する。このような植物では、ニコチンレベルが実質的に低減されているため、これらの植物におけるTSNA 50

(28)

JP 2004-507250 A 2004.3.31

レベルも付随して低減されている。

【0085】

これらの実験から、Nic 遺伝子産物と相互に作用する分子デコイで形質転換されたタバコは、低減された量のニコチンおよび/またはTSNAを示すことがわかる。低減されたNicPT1発現および低減されたニコチンレベルを有する分子デコイの多数のタンデム挿入物を有する植物は、商業的に価値がある産物の発現および低減されたニコチンおよび/またはTSNA含量を有するタバコ製品の製造に使用される。

【0086】

【実施例8】

【低ニコチンおよびTSNAブレンドタバコ】

以下の実施例に、ブレンドによって、ある特定の量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコ製品を作る幾つかの方法を記載する。幾つかのブレンド方法は、極めて低量のニコチンおよび/またはTSNAを有する要体から産生したタバコで開始する。低ニコチン/TSNA要体（たとえば、検出可能なレベルのニコチンおよび/またはTSNA）から調製されたタバコを、従来のタバコ（たとえば、30,000ppmのニコチンおよび8,000ppbのTSNAを有するバレータバコ、20,000ppmのニコチンおよび300ppbのTSNAを有する火力乾燥タバコ、および10,000ppmのニコチンおよび100ppbのTSNAを有する東洋タバコ）とブレンドすることによって、実質的に所望の量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコ製品を製造することができ。タバコ使用者が、ニコチン依存性を低減させまたは排除するのを助け、また発癌性の可能性を低減させるために、様々な量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコ製品を、タバコ使用中止キットおよびプログラムに組み込むことができる。

【0087】

たとえば、ステップ1タバコ製品は、低ニコチン/TSNAタバコおよび/または従来のタバコ75%を含んでもよく、ステップ2タバコ製品は、低ニコチン/TSNAタバコおよび/または従来のタバコ50%を含んでもよく、ステップ3タバコ製品は、低ニコチン/TSNAタバコおよび/または従来のタバコ25%を含んでもよく、ステップ4タバコ製品は、低ニコチン/TSNAタバコ100%および従来のタバコ0%を含んでもよい。1ヶ月プログラムの場合、タバコ使用中止キットは、消費者を満足させるために、前述の各ブレンドから同量のタバコ製品を含んでもよい。すなわち、たとえば、消費者が1日1パックの喫煙者であれば、1ヶ月キットは、各ステップから7パック、計28パックのシガレットを与える。各タバコ使用中止キットは、消費者を段階的な方法で具体的に誘導する一組の説明書を含む。もちろん、消費者がそれぞれ要望するニコチンおよび/またはTSNAの量を選択できるように、明確な量のニコチンおよび/またはTSNAを有するタバコ製品を、便利なサイズで利用できるようになるであろう（たとえば、シガレットの箱、シガレットのバック、喫煙タバコの缶、および噛みタバコの小袋のみ）。本明細書に記載の教示を使用して様々な低ニコチン/低TSNAタバコブレンドを得る方法は多く、以下の説明は当業者を1つの可能なアプローチに誘導することのみを目的とする。

【0088】

低ニコチン/TSNA25%のブレンドである、ステップ1タバコ製品を得るために、およそ0ppmのニコチン/TSNAタバコから作製されたタバコを、従来のバレータバコ、火力乾燥タバコ、または東洋タバコと、それぞれ25%/75%比で混合して、22,500ppmのニコチンおよび6,000ppbのTSNAを有するバレータバコ製品、15,000ppmのニコチンおよび2,250ppbのTSNAを有する火力乾燥タバコ製品、および7,500ppmのニコチンおよび750ppbのTSNAを有する東洋タバコ製品を得ることができる。同様に、低ニコチン/TSNA50%のブレンドであるステップ2製品を得るために、およそ0ppmのニコチン/TSNAタバコから作製されたタバコを、従来のバレータバコ、火力乾燥タバコ、または東洋タバコと、それぞれ50%/50%比で混合して、15,000ppmのニコチンおよび4,000ppbのTSNAを

(29)

JP 2004-307250 A 2004.3.31

有するBurlyタバコ製品、10,000ppmのニコチンおよび150ppbのTSNAを有する火力乾燥タバコ製品、および5000ppmのニコチンおよび50ppbのTSNAを有する東洋タバコ製品を得ることができる。さらに、75%/25%の低ニコチン/TSNAブレンドであるステップ3の製品を得るために、およそ0ppmのニコチン/TSNAタバコから作製されたタバコを、従来のバレータバコ、火力乾燥タバコ、または東洋タバコと、それぞれ75%/25%比で混合して、7,500ppmのニコチンおよび2,000ppbのTSNAを有するBurlyタバコ製品、5,000ppmのニコチンおよび75ppbのTSNAを有するFlue-Cured製品、および2,500ppmのニコチンおよび25ppbのTSNAを有するOriental製品を得ることができる。

【0089】

タバコ製品は、多くの場合、世界の多くの異なる地域で、様々な栽培条件下で栽培された、多くの異なるタイプのブレンドであることを、よく理解すべきである。結果として、ニコチンおよびTSNAの量は、農産物ごとに異なる。それにもかかわらず、従来の技術を使用することによって、所望のブレンドを作るのに使用する農産物当たりのニコチンおよびTSNAの平均量を、容易に決定することができる。ブレンドを構成するタバコの各タイプの量を調節することによって、熟練者は、ニコチンおよび/またはTSNAの量を、他の考慮すべき事項、たとえば外観、風味、および燃焼適性などと調和させることができる。この方式で、様々なレベルのニコチンおよび/またはニトロソアミン、ならびに外観、風味および燃焼適性を有する様々なタイプのタバコ製品を作ることができる。

【0090】

前述は、本発明を説明するものであって、本発明を制限するものと考えてはならない。本発明は、請求の範囲、および中に含まれるべき請求の範囲の均等物によって規定される。本明細書に引用した全ての参考文献は、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】ニコチン生成につながる生合成経路を示す図である。Nic1およびNic2により制御されることが判明している酵素活性は、QPTase（キノリネートホスホリボシルトランスフェラーゼ）およびPMTase（腐敗メチルトランスフェラーゼ）である。QPTaseおよびPMTaseは、ニコチン生成における連続酵素ステップであり、従って、ニコチンレベルはQPTase活性およびPMTase活性に正比例する。

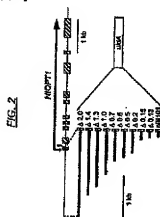
【図2】NtQPT1遺伝子およびNtQPT1プロモーターuidAキメラの図式による表示である。転写開始点（+1）で示し、矢印はNtQPT1転写物を示す。エキソン10個を、平行線模様をつけた棒として示す。プロモーターの欠失シリーズも、プロモーターの5'末端から切断された中央の棒として示す。β-グルクロニダーゼ（GUS）をコードする、uidA遺伝子に融合したプロモーターフラグメントのサイズを、キロ塩基対（kb）（すなわちΔ2.0、Δ1.4、等）で示す。キメラNtQPT1プロモーターuidA融合体を、pBI101にクローニングした。

【図3】CaMV 35Sプロモーター（CaMV 35S）、プロモーターレスGUS（pBI101）、およびGUSに融合したTobRD2（NtQPT1をコードする遺伝子）プロモーターの5'キヌテッド欠失を担持するトランスジェニックタバコ植物の根、葉、および茎におけるβ-グルクロニダーゼ（GUS）活性を示す図である。uidA遺伝子に融合したプロモーターフラグメントのサイズを、キロ塩基対（kb）で示す（すなわちΔ2.0、Δ1.4、等）。各標本について、少なくとも20の独立した葉質転換体を分析した。

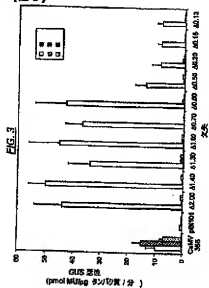
【圖 1】



【圖 2】



【圖 3】











(F2)

JP 2004-507250 A 2004.3.11

34

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/JP 02/03786

ENTRY	REPRESENTATIVE OF THE INVENTOR	INVENTOR
1	TO O RISE 100 A (INFORMA BUCO 00)	20-01
2	10.000000 1000 (1000-01-14)	20-02
3	PAGE 1, 1000 1000	20-03
4	10.000000 1000 (1000-01-14)	20-04
5	PAGE 2, 1000 1000	20-05
6	PAGE 3, 1000 1000	20-06
7	PAGE 4, 1000 1000	20-07
8	PAGE 5, 1000 1000	20-08
9	PAGE 6, 1000 1000	20-09
10	PAGE 7, 1000 1000	20-10
11	PAGE 8, 1000 1000	20-11
12	PAGE 9, 1000 1000	20-12
13	PAGE 10, 1000 1000	20-13
14	PAGE 11, 1000 1000	20-14
15	PAGE 12, 1000 1000	20-15
16	PAGE 13, 1000 1000	20-16
17	PAGE 14, 1000 1000	20-17
18	PAGE 15, 1000 1000	20-18
19	PAGE 16, 1000 1000	20-19
20	PAGE 17, 1000 1000	20-20
21	PAGE 18, 1000 1000	20-21
22	PAGE 19, 1000 1000	20-22
23	PAGE 20, 1000 1000	20-23
24	PAGE 21, 1000 1000	20-24
25	PAGE 22, 1000 1000	20-25
26	PAGE 23, 1000 1000	20-26
27	PAGE 24, 1000 1000	20-27
28	PAGE 25, 1000 1000	20-28
29	PAGE 26, 1000 1000	20-29
30	PAGE 27, 1000 1000	20-30
31	PAGE 28, 1000 1000	20-31
32	PAGE 29, 1000 1000	20-32
33	PAGE 30, 1000 1000	20-33
34	PAGE 31, 1000 1000	20-34
35	PAGE 32, 1000 1000	20-35
36	PAGE 33, 1000 1000	20-36
37	PAGE 34, 1000 1000	20-37
38	PAGE 35, 1000 1000	20-38
39	PAGE 36, 1000 1000	20-39
40	PAGE 37, 1000 1000	20-40
41	PAGE 38, 1000 1000	20-41
42	PAGE 39, 1000 1000	20-42
43	PAGE 40, 1000 1000	20-43
44	PAGE 41, 1000 1000	20-44
45	PAGE 42, 1000 1000	20-45
46	PAGE 43, 1000 1000	20-46
47	PAGE 44, 1000 1000	20-47
48	PAGE 45, 1000 1000	20-48
49	PAGE 46, 1000 1000	20-49
50	PAGE 47, 1000 1000	20-50
51	PAGE 48, 1000 1000	20-51
52	PAGE 49, 1000 1000	20-52
53	PAGE 50, 1000 1000	20-53
54	PAGE 51, 1000 1000	20-54
55	PAGE 52, 1000 1000	20-55
56	PAGE 53, 1000 1000	20-56
57	PAGE 54, 1000 1000	20-57
58	PAGE 55, 1000 1000	20-58
59	PAGE 56, 1000 1000	20-59
60	PAGE 57, 1000 1000	20-60
61	PAGE 58, 1000 1000	20-61
62	PAGE 59, 1000 1000	20-62
63	PAGE 60, 1000 1000	20-63
64	PAGE 61, 1000 1000	20-64
65	PAGE 62, 1000 1000	20-65
66	PAGE 63, 1000 1000	20-66
67	PAGE 64, 1000 1000	20-67
68	PAGE 65, 1000 1000	20-68
69	PAGE 66, 1000 1000	20-69
70	PAGE 67, 1000 1000	20-70
71	PAGE 68, 1000 1000	20-71
72	PAGE 69, 1000 1000	20-72
73	PAGE 70, 1000 1000	20-73
74	PAGE 71, 1000 1000	20-74
75	PAGE 72, 1000 1000	20-75
76	PAGE 73, 1000 1000	20-76
77	PAGE 74, 1000 1000	20-77
78	PAGE 75, 1000 1000	20-78
79	PAGE 76, 1000 1000	20-79
80	PAGE 77, 1000 1000	20-80
81	PAGE 78, 1000 1000	20-81
82	PAGE 79, 1000 1000	20-82
83	PAGE 80, 1000 1000	20-83
84	PAGE 81, 1000 1000	20-84
85	PAGE 82, 1000 1000	20-85
86	PAGE 83, 1000 1000	20-86
87	PAGE 84, 1000 1000	20-87
88	PAGE 85, 1000 1000	20-88
89	PAGE 86, 1000 1000	20-89
90	PAGE 87, 1000 1000	20-90
91	PAGE 88, 1000 1000	20-91
92	PAGE 89, 1000 1000	20-92
93	PAGE 90, 1000 1000	20-93
94	PAGE 91, 1000 1000	20-94
95	PAGE 92, 1000 1000	20-95
96	PAGE 93, 1000 1000	20-96
97	PAGE 94, 1000 1000	20-97
98	PAGE 95, 1000 1000	20-98
99	PAGE 96, 1000 1000	20-99
100	PAGE 97, 1000 1000	20-100

PAGE 2 OF 2

JP 2004-307250 A 2004.3.11

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
IPC Class. Subclass. and Class.			
Report number and date of issue	Publication date	Search report date	Examination date
NO 976281 A	19-12-1997	AS AU EP JP US	17-11-1999 18-12-1999 08-02-1999 17-10-1998 18-02-1999
NO 934768 A	05-05-1993	JP US	11-09-1993 08-09-1992
EP 090502 A	14-02-1995	AT AU EP US	19-11-1999 18-12-1999 14-03-1998 18-02-1999
NO 931883 B	04-05-1993	EP US	25-10-1994 18-02-1993
NO 956403 A	13-10-1996	AT AU EP JP US	18-12-1999 18-12-1999 14-03-1998 18-02-1999 18-02-1999

550

JP 2004-507250 A 2004.3.11

36

## フロントページの続き

(5A) Int. Cl.?

FI

テーマコード (参考)

C12N 5/10

C I 2 N 5/00

C

C12N 5/00

R

(S1)指定国 AP,CH,OM,KE,LS,MW,MZ,SD,SI,SZ,TZ,UZ,TN,EA,AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM,EP,AY,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GH,GR,IE,IT,LU,MC,ML,PT,SE,TG,GA,BF,BJ,CF,CG,CI,OM,GA,GN,GO,GM,MR,NE,SI,TD,TG,AE,AC,AM,AN,AT,AW,BE,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CM,CO,CR,CJ,CZ,DE,DK,DM,DZ,EG,EE,ES,FI,GH,GO,GR,GN,GR,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LU,LR,LS,IT,LU,LV,MD,MO,NG,MK,MM,MY,MZ,NE,NO,AZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TZ,UA,UG,UZ,UY,VN,YU,ZA,ZH

(72)発明者 コンクリング、マーク・エイ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27510, チャペル・ヒル, ニュー・ライズ・コート 55

(72)発明者 リー、ヤン

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27713, ダーラム, ブリッジウッド・ドライブ 4908

Fターム(参考) ZB030 AA02 AB03 AD09 CA17 CB02 CD03 CE07 CF17

4B024	AA08	BA80	CA04	CA05	DA01	DA02	DA05	DA11	DA12	EAD4
-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

FA02	FA07	FA10	GA11	GA17	GA18	GA19	HA08	HA18
------	------	------	------	------	------	------	------	------

48065 AA01X AA57X AA72X AA80X AA88Y AA90X AB01 AC14 AC20 BA03

BA25 CA24 CA53

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-503030
受付番号	10602180111
書類名	刊行物等提出書
担当官	山本 雅子 7668
作成日	平成19年 1月10日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【提出された物件の記事】

【提出物件名】	資料1	1
【提出物件名】	資料2	1
【提出物件名】	資料3	1
【提出物件名】	資料4	1
【提出物件名】	資料5	1
【提出物件名】	資料6	1
【提出物件名】	資料7	1
【提出物件名】	資料8	1